

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

---

**Pharmakologische Präkonditionierung zur Reduktion des Ischämie-/  
Reperfusionsschadens der Leber in einem isolierten Perfusionsmodell an der  
Ratte**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

2011

vorgelegt von Michael Thomas Schmidt  
geboren am 01.09.1980 in Neunkirchen/Saar

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>Summary.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
3.1 Versuchstiere.....	11
3.2 Leberexplantation.....	11
3.3 Die isolierte Leberperfusion.....	11
3.4 Proben.....	12
3.5 Lipidperoxidation.....	12
3.6 Histologie und Immunhistochemie.....	13
3.7 Western Blot Analysen.....	14
3.8 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll.....	14
3.9 MDDP Präkonditionierung.....	15
3.10 Amiodaron Präkonditionierung.....	16
3.11 Statistische Auswertung.....	17
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 MDDP Präkonditionierung.....</b>	<b>18</b>
4.1.1 Metabolische Parameter und Leberschädigung.....	18
4.1.2 Zytokinfreisetzung.....	20
4.1.3 Stressantwort und Lipidperoxidation.....	21
4.1.4 Leukozyteninvasion.....	23
4.1.5 Histomorphologie und apoptotischer Zelltod.....	24
<b>4.2 Amiodaron Präkonditionierung.....</b>	<b>27</b>
4.2.1 Hämodynamische und metabolische Parameter.....	27
4.2.2 Ischämische Parameter und Leberschädigung.....	30
4.2.3 Mitochondriale Schädigung und Lipidperoxidation.....	31
4.2.4 Gallefluss und Lebergewicht.....	34
4.2.5 Histologie der Lebern.....	36
4.2.6 Apoptotischer Zelltod und Stressantwort.....	36

4.2.7	Tumornekrosefaktor-alpha .....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung/Publikationen.....</b>	<b>57</b>
7.1	Danksagung.....	57
7.2	Publikationen.....	58
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>59</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ALAT	Alaninaminotransferase
AM	Amiodaron
ASAT	Aspartataminotransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HO-1	Hämoxygenase-1
HTK	Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate
I/R	Ischämie-Reperfusion
K <sup>+</sup>	Kalium
KHB	Krebs Henseleit Bicarbonat Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
GP	Gesamtprotein
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling essay
EPO	Erythropoietin
GSH	Glutathion
IL-6	Interleukin-6
MDDP	Short-Term Multidrug Donor Preconditioning
NAC	N-Acetylcystein
PTX	Pentoxifyllin
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
ST	Simvastatin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
UW	University of Wisconsin

## 1 Zusammenfassung

Das primäre Organversagen stellt immer noch ein großes Problem bei Lebertransplantationen dar. Es wurden bereits verschiedene Methoden der Vorbehandlung von Spenderorganen entwickelt, mit dem Ziel Organschäden nach Organtransplantationen zu verringern.

Die erste Versuchsreihe wurde mit der Fragestellung durchgeführt, ob eine Multidrug Donor Präkonditionierung (MDDP) in einem isolierten blutzellfreien ex vivo Perfusionsmodell an der Rattenleber nicht nur den Schaden, der durch kalte Ischämie und Reperfusion entsteht, vermindern sondern diesen auch vollständig verhindern kann. Die Vorbehandlung mit MDDP beinhaltete die intragastrale Applikation von 50 µg/kg Körpergewicht (KG) Curcumin und 5 mg/kg KG Simvastatin, die intraperitoneale Verabreichung von 150 mg/kg KG N-Acetylcystein, 3000 IU/kg KG Erythropoietin, 50 mg/kg KG Pentoxifyllin und 10 mg/kg KG Melatonin, sowie die intravenöse Verabreichung von 100 mg/kg KG Glyzin und 5 mg/kg KG Methylprednisolon. Die postischämische Reperfusion wurde mit 37°C warmem Krebs Henseleit Bikarbonatpuffer durchgeführt, nachdem das Organ einer kalten Ischämie über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4°C kalter HTK-Lösung ausgesetzt war. Die Ischämie/Reperfusion der Leber bewirkte eine massive Freisetzung von Kalium, den Verlust von Proteinen und einen Anstieg von ASAT, ALAT und LDH. Hiermit verbunden war eine signifikante Hämoxygenase-1 (HO-1) Stressantwort, eine verstärkte Bildung von Malondialdehyd, eine Zunahme der Produktion von TNF-alpha und IL-6, eine ausgeprägte Gewebeeinfiltration von Leukozyten und eine Zunahme des durch Apoptose verursachten Zelltods. Die MDDP Präkonditionierung bewirkte eine signifikante Reduktion der postischämischen Stressantwort und der inflammatorischen Reaktion auf die Zellen und zeigte sich geeignet, der Manifestierung von parenchymatösen Schäden vollständig entgegen zu wirken. Verglichen mit der Vorbehandlung durch Gabe einer einzelnen Substanz könnte die Präkonditionierung durch MDDP folglich eine stärkere protektive Wirkung hervorrufen und würde daher einen interessanten Lösungsansatz darstellen, um das Ergebnis bei Lebertransplantationen zu verbessern.

Im zweiten Teil der Arbeit war das Ziel herauszufinden, wie sich eine Vorbehandlung mit Amiodaron (AM) auf die Funktion und Morphologie der Leber während einer Reperfusion nach vorausgegangener kalter Ischämie auswirkt. Bei AM handelt es sich um eines der am häufigsten eingesetzten anti-arrhythmisch wirkenden Medikamente auch bei Organspendern, welches insbesondere in Notfallsituationen gegeben wird. Neben seinem anti-arrhythmischen Wirkungspotential besitzt AM auch antioxidative Eigenschaften in den Herzmuskelzellen. Daher war es von Interesse herauszufinden, ob die Präkonditionierung durch Gabe von AM sich als wirkungsvoll erweist, die Qualität und Funktion von Lebern, die

für die Konservierung und Transplantation bereitgestellt werden, zu verbessern.

Die Spenderratten wurden mit AM vorbehandelt (5 mg/kg KG), 10 Minuten bevor die Durchspülung der Lebern mit 4°C kalter HTK-Lösung erfolgte. Vergleichbar wie im ersten Versuchsabschnitt wurden die Lebern anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt, bevor die ex situ Reperfusion mit 37°C warmer Krebs Henseleit-Lösung 60 Minuten lang in einem nicht rezirkulierenden System erfolgte. Am Ende der Reperfusion wurden die Gewebeproben für histologische und Western Blot Untersuchungen entnommen. Tiere, die nur den Trägerstoff erhielten (0,9% NaCl), dienten als Kontrollen (I/R-Kontrollen). Lebern von unbehandelten Tieren, welche keiner 24-stündigen kalten Ischämie ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrollen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Vorbehandlung mit AM wirkungsvoll die Lipidperoxidation, die Freisetzung von Stressproteinen und den durch Apoptose ausgelösten Zelltod vermindern konnte. Dies ergab sich aus einer durch AM vermittelten Reduktion des Malondialdehyds, der HO-1 und der Caspase-3 Aktivität. Dennoch führte die Vorbehandlung mit AM auch zu Schäden an den Mitochondrien und verursachte exkretorische Dysfunktion der Leber, was durch einen signifikanten Anstieg der GLDH Aktivität und einer verminderten Galleproduktion zum Ausdruck kam. Im zweiten Versuchsabschnitt stellte sich also heraus, dass die Vorbehandlung mit AM antioxidative Schutzfunktionen auf die Leber während der Konservierung und Reperfusion ausübt. Allerdings geht diese protektive Wirkung des AM auch mit der Induktion von mitochondrialen Schäden und einer hepatozellulären Funktionsbeeinträchtigung einher. Daher sollte die Vorbehandlung von Spendern mit AM zur antiarrhythmischen Therapie mit Vorsicht durchgeführt werden.

## Summary

Primary graft dysfunction still represents a major challenge in liver transplantation. Various modes of donor preconditioning have been introduced to reduce post-transplant organ injury. By asking the question whether a multidrug donor preconditioning (MDDP) in an ex vivo blood-cell-free isolated rat liver perfusion model is able not only to reduce but to completely prevent cold ischemia-reperfusion injury in liver I conducted the first series of experiments.

MDDP included pre-ischemic intragastric application of 50µg/kg body weight (bw) curcumin and 5mg/kg bw simvastatin, intraperitoneal application of 150mg/kg bw N-acetylcysteine, 3000IU/kg bw erythropoietin, 50mg/kg bw pentoxifylline and 10mg/kg bw melatonin, as well as intravenous application of 100mg/kg bw glycine and 5mg/kg bw methylprednisolone. Postischemic reperfusion was performed after 24h cold storage in 4°C HTK solution with 37°C Krebs Henseleit bicarbonate buffer. Cold hepatic ischemia-reperfusion (I/R) resulted in a massive K<sup>+</sup> release, protein loss, and ASAT, ALAT and LDH elevation. This was associated with a significant heme oxygenase-1 (HO-1) stress response, increased malondialdehyde formation, enhanced TNF-alpha and IL-6 production, pronounced leukocytic tissue infiltration, and apoptotic cell death. MDDP abolished the postischemic stress and inflammation response and was capable of completely preventing the manifestation of parenchymal injury. Thus, MDDP potentiates the protective effects reported after single-drug donor preconditioning, and may therefore be an interesting approach to improve the outcome in clinical liver transplantation.

In the second part of my thesis the effects of a pretreatment with amiodarone (AM) were studied on liver function and hepatocellular morphology during reperfusion after cold ischemia of 24h. AM is one of the most frequently used anti-arrhythmic drugs also given in organ donors which is given in particular in emergency situations. Apart from its anti-arrhythmic actions AM has been shown to provide anti-oxidative properties in cardiomyocytes. Thus, I was interested whether AM donor pretreatment affects organ quality and function of livers procured for preservation and transplantation.

Donor rats were pretreated with AM (5mg/kg bw) 10min before flushout the liver with 4°C cold HTK solution. Like in the first part of my experimental studies livers were then stored for 24h at 4°C before ex situ reperfusion was performed with 37°C Krebs Henseleit solution for 60min in a non-recirculating system. At the end of reperfusion tissue samples were taken for histology and Western blot analyses. Animals treated with vehicle only (0.9% NaCl) served as ischemia/reperfusion (I/R) controls. Additional livers of untreated animals not subjected to 24h cold ischemia served as sham controls.

AM pretreatment effectively attenuated lipid peroxidation, stress protein expression and apoptotic cell death. This was indicated by an AM-mediated reduction of malondialdehyde,

heme oxygenase-1 and caspase-3 activation. However, AM treatment also induced mitochondrial damage and hepatocellular excretory dysfunction, as indicated by a significantly increased GLDH concentration in the effluate and a decreased bile production. Thus, AM donor pretreatment exerts anti-oxidative actions in liver preservation and reperfusion. However, this protective AM action is counteracted by an induction of mitochondrial damage and hepatocellular dysfunction. Accordingly, AM pretreatment of donors for anti-arrhythmic therapy should be performed with caution.



## 2 Einleitung

Der Konservierungs- und Reperfusionsschaden, der trotz der erfolgreichen Verwendung von verschiedenen Konservierungslösungen für Organe, wie zum Beispiel der Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK)-Lösung und der University of Wisconsin (UW)-Lösung noch immer auftritt, stellt bei der Lebertransplantation ein großes Problem dar [Franco-Gou R et al., 2007]. Der Schaden am Spenderorgan, der durch die kalte Ischämie und Reperfusion ausgelöst wird und durch Beeinträchtigung der sinusoidalen Zellen hervorgerufen wird [McKeown CMB et al., 1988], kann zum primären Versagen der Spenderleber führen. Tatsächlich trägt das primäre Versagen der Spenderleber maßgeblich zur Morbidität und Mortalität unter den Empfängern der transplantierten Lebern bei [Jain A et al., 2000]. Die Inzidenz des primären Organversagens nach Transplantation wird mit 4,6 bis 14,6% [Jain A et al., 2000; Schrem H et al., 2008] angegeben. Im Hinblick auf die weltweite Knappheit von Spenderorganen sollten Verfahren etabliert werden, mit dem Ziel Schädigungen, die durch Ischämie/Reperfusion (I/R) entstehen, weiter zu reduzieren [Franco-Gou R et al., 2007; Fukuda C et al., 2002; Hata K et al., 2006].

Die Präkonditionierung von Spenderlebern ist eine zusätzliche Methode, Ischämie- und Reperfusionsschäden, die an dem Organ bereits während der Explantation auftreten können, weiter zu minimieren [Nishizawa H et al., 1997; Lai IR et al., 2008; Montero EF et al., 2005]. Hierbei werden die Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen bei ausreichend zur Verfügung stehenden energiereichen Phosphaten, die für die intrazelluläre Aufnahme der Substanzen notwendig ist, appliziert (Sandker GW et al., 1992; Schilling M et al., 1998). Hingegen wäre das Hinzufügen dieser Wirkstoffe in die Konservierungslösung mit pharmakologischen Nachteilen verbunden, da der Verbrauch energiereicher Phosphate während der Konservierungsphase steigt und somit unter Umständen sogar zu entgegengesetzten Effekten führen kann. [Ainscow EK et Brand MD, 1999].

Versuche mit etablierter Vorbehandlung wurden sowohl in Kurzzeit-, wie in Langzeitstudien durchgeführt. Langzeitstudien, in denen die Regulierung der Kupfferzellen oder die Expression des durch Doxorubicin induzierten Hitzeschockproteins 72 beschrieben wurden [Chen H et al., 2004; Rentsch M et al., 2005], können aufgrund der eingeschränkten Umsetzbarkeit bei der Organaufbewahrung nicht auf die klinische Routinetätigkeit übertragen werden. Dagegen wurden interessante Versuche in Kurzzeitstudien durchgeführt, die Curcumin [Shen SQ et al., 2007], Pentoxifyllin [Nishizawa H et al., 1997; El-Ghoneimi A et al., 2007], Simvastatin [Lai IR et al., 2008], N-Acetylcystein [Montero EF et al., 2005], Erythropoietin [Johnson DW et al., 2006; Schmeding M et al., 2007], Melatonin [Kim SH et al., 2009; Zhang SJ et al., 2006], Glyzin [Duenschede F et al., 2006] und Methylprednisolon [Glanemann M et al., 2004; Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003] eine Schutzfunktion für

transplantierte Organe zusprechen. Diese könnten in der Tat in die klinische Praxis umgesetzt werden und damit die klinischen Ergebnisse bei der Lebertransplantation verbessern.

In der Literatur werden zahlreiche Versuche beschrieben, die auf Vorbehandlungen in Form kurzzeitiger Einzelwirkstoffgaben basieren, und eine Verminderung der kalten bzw. warmen hepatischen I/R Schädigung bewirken [Nishizawa H et al., 1997; Lai IR et al., 2008; Montero EF et al., 2005; Shen SQ et al., 2007; El-Ghoneimi A et al., 2007; Johnson DW et al., 2006; Schmeding M et al., 2007; Kim SH et al., 2008; Zhang WH et al., 2006; Duenschede F et al., 2006; Glanemann M et al., 2004; Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003].

Mit dem Ziel den Schutz vor I/R während der kalten Leberkonservierung und Reperfusion weiter zu verbessern, wurde im ersten Versuchsabschnitt an Hand von einem isolierten Rattenleberperfusionsmodell untersucht, ob die Präkonditionierung durch Gabe einer Kombination von protektiven Substanzen (Multidrugs), nämlich Curcumin, Pentoxifyllin, Simvastatin, N-Acetylcystein, Erythropoietin, Melatonin, Glyzin und Methylprednisolon, dazu geeignet ist, den kalten Ischämie-Reperfusionsschaden nicht nur zu vermindern, sondern diesen vollständig aufzuheben.

Eine weitere Herausforderung in der Transplantationsmedizin ist die Tatsache, dass weltweit die Zahl der Menschen, die auf ein Spenderorgan warten, jährlich steigt, das Angebot an Transplantaten hingegen wesentlich langsamer zunimmt. Da die Nachfrage nach Spenderlebern das Angebot bei weitem übersteigt, führt die zunehmende Diskrepanz dazu, dass vermehrt Organe minderer Qualität von hirntoten Spendern für die Transplantation bereitgestellt werden [Eurotransplant Report 2007; Wolff M et al., 2003; Moussavian MR et al., 2007]. Mit dem Ziel, die organischen Funktionsbeeinträchtigungen nach erfolgter Transplantation zu minimieren, konzentrierten sich die Bemühungen in der Forschung während der letzten zehn Jahre nicht nur auf neue therapeutische Ansätze, um den Schaden, der durch die Konservierung und Reperfusion entsteht zu reduzieren, sondern beinhalteten auch die Möglichkeiten der Vorbehandlung dieser als kritisch einzustufenden Organspender [Zhang SJ et al., 2006; Cicco G et al., 2005; Richter S et al., 2000].

Hirntote Spender zeigen häufig kardiopulmonale Begleiterkrankungen. Dabei entwickeln zwischen fünfzig und neunzig Prozent der Spender mit Subarachnoidalblutungen oder einem Schlaganfall kardiale Rhythmusstörungen [Di Pasquale G et al., 1987; Wartenberg KE et al., 2006; Cheung RT et Hachinski V, 2004; Colivicchi F et al., 2004]. Die Mehrzahl von diesen Herzrhythmusstörungen sind benigne, so zum Beispiel Sinustachykardie, Sinusbradykardie und vorzeitig auftretende atriale oder ventrikuläre Extrasystolen. Bei bis zu fünf Prozent aller Spender jedoch treten Kammertachykardien und Vorhoftachyarrhythmien auf, welche die kardiale Pumpleistung und in dem Zusammenhang auch die Perfusion des Spenderorgans erheblich beeinträchtigen [Naidech AM et al., 2005; Salim A et al., 2006; Nygaard CE et al.,

1990]. Um die Füllung des Herzens während der Diastole zu stabilisieren und um Durchblutungsstörungen oder Embolien im Organ zu vermeiden, werden Herzrhythmusstörungen häufig mit Amiodaron (AM) behandelt [Tomlinson DR et al., 2008; Vassallo P et Trohman RG, 2007]. Während die antiarrhythmischen Eigenschaften von AM bereits ausführlich erforscht wurden, ist noch immer wenig über dessen pharmakologische Auswirkungen bei Hirntodspendern bekannt. Interessant ist hierbei, dass für AM bereits antioxidative Schutzeigenschaften neben seinem antiarrhythmischen Wirkungspotential nachgewiesen wurden [Lapenna D et al., 2001]. Andererseits werden in experimentellen und klinischen Untersuchungen aber auch hepatotoxische Auswirkungen, die durch AM bedingt sind, beschrieben [Chan AL et al., 2008; Rätz Bravo AE et al., 2005; Reasor MJ et al., 1996]. Diese könnten sich negativ auf die Morphologie und die Funktion der Leber nach einer Konservierung für den Zweck der Organtransplantation auswirken.

Mit dem Ziel die Eigenschaften von AM im Rahmen der Konservierung und Transplantation weiter zu klären, wurden im zweiten Versuchsabschnitt die Auswirkungen der Präkonditionierung mit AM auf Stressantwort, Lipidperoxidation, hepatozelluläre Morphologie und Leberfunktion in einem Model der kalten Ischämie und Reperfusion an der Rattenleber untersucht.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Nach Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörde wurden die Versuche entsprechend den Vorgaben der nationalen Institute, die für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren zuständig sind durchgeführt (NIH publication 86-23, revised 1985). Verwendet wurden Sprague-Dawley Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 280 und 330 Gramm. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei 22°C bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel Zyklus gehalten und erhielten Standardnahrung und Wasser ad libitum. Durchgeführt wurden die Versuche im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

#### **3.2 Leberexplantation**

Die Ratten wurden mit Pentobarbital Natrium (50 mg/kg KG i.p. (Narcoren, Merial, Halbergmoons, Germany)) anästhesiert. Um die Spontanatmung zu erleichtern wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Nach der Laparotomie wurde der Hauptgallengang kanüliert und die Galle über einen Zeitraum von 20 Minuten gesammelt, um Ausgangswerte zur Produktionsmenge an Galleflüssigkeit zu bestimmen. Nach einer systemischen Antikoagulation mit 500 I.E. Heparin, wurden die Lebern mit 100 ml 4°C kalter HTK-Lösung (Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, Germany) über einen aortalen Katheter mit einem Druck von 90 cm Wassersäule durchspült. Die Lebern wurden direkt entnommen, gewogen und in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt.

#### **3.3 Die isolierte Leberperfusion**

Nach 24 Stunden kalter Konservierung wurden die Lebern über die Portalvene in einem nicht rezirkulierenden System reperfundiert [Moussavian MR et al., 2009]. Die Perfusion erfolgte mit frisch zubereitetem Krebs Henseleit Bikarbonat Puffer (KHB), der mit Carbogen angereichert wurde. Unter Verwendung einer pulsatilen Perfusionspumpe (Beta/4, ProMinent, Heidelberg, Germany) erfolgte die Reperfusion bei einer Flussrate von 2 ml/min\* $g$  Lebergewebe. Dadurch konnte der portalvenöse Druck kontinuierlich während der Reperfusion gemessen werden. Proben aus dem Effluat wurden nach 1 Minute, 30 Minuten und 60 Minuten über einen infrahepatischen Katheter der Vena cava gesammelt, um die Enzymaktivitäten der Alanintransaminase (ALAT), Aspartattransaminase (ASAT), Laktatdehydrogenase (LDH) und Glutamatdehydrogenase (GLDH), sowie die Konzentrationen von Kaliumionen ( $K^+$ ), Malondialdehyd (MDA) und dem Gesamtprotein (GP)

zu messen.

Um die exkretorische Funktion der Leber zu bestimmen, wurde das Gewicht der Galleflüssigkeit in Intervallen von 30 Minuten über einen Gesamtzeitraum von 60 Minuten gemessen. Außerdem wurden Perfusatproben aus dem Einstrom in die Portalvene und dem Ausstrom aus der infrahepatischen Vena cava nach 1 Minute, 30 Minuten und 60 Minuten zur Bestimmung des pH-Werts entnommen. Ferner wurde in jeder Perfusatprobe der  $pO_2$  und der  $pCO_2$  gemessen. Der Sauerstoffverbrauch der Leber wurde dann folgendermaßen errechnet: Sauerstoffverbrauch [mol/min\*g Lebergewebe] = ( $pO_2$  Einstrom -  $pO_2$  Ausstrom [mmHg])\*0.00136 [mol/ml\*mmHg]/Flußrate [ml/min\*g Lebergewebe]. Die  $CO_2$  Produktion wurde aus der Differenz zwischen  $pCO_2$  Ausstrom und  $pCO_2$  Einstrom errechnet.

### 3.4 Proben

Das Volumen der Galleflüssigkeit wurde gemessen und auf Gramm Lebergewicht umgerechnet [ $\mu$ L/min\*g Lebergewebe]. Die Leberenzyme LDH, GLDH, ASAT und ALAT aus den Perfusatproben wurde mit der spektrophotometrischen Methode bestimmt. Kalium, pH und Blutgase wurden durch Blutgas- und Elektrolytanalysen ermittelt (Rapidlab 855, Bayer Health Care, Fernwald, Germany). Plasma Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und Interleukin-6 (IL-6) wurden über das Verfahren des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) gemäß der Fabrikationsanleitung (R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt, Germany) bestimmt. Nach der kalten Konservierung und postischämischen Reperfusion wurde das Lebergewebe für histologische Untersuchungen in Formalin und Western Blot Analysen bei -80°C aufbewahrt.

### 3.5 Lipidperoxidation

Der oxidative Stress wurde über die Bildung von Malondialdehyd (MDA) ermittelt. MDA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Das Probenmaterial wurde mit 10-prozentiger Trichloroacetatsäure im Verhältnis 1:3 auf Eis inkubiert, um die Eiweiße auszufällen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 2200\*g. Der dadurch gewonnene Überstand wurde 1:2 mit 0,67-prozentiger Thiobarbituratsäure vermischt und anschließend 10 Minuten lang in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Messung mittels eines Elisareaders (DigiScan, Asys Hitech, Deelux Labortechnik, Gödendorf, Germany). Die Absorption wurde in einem Bereich von 550 nm gemessen. Das Ausmaß der Thiobarbituratsäure-Reaktion in Konzentrationen zwischen 0 und 100  $\mu$ mol wurde dabei für die Etablierung der Standardkurve verwendet.

### 3.6 Histologie und Immunhistochemie

Für die Auswertung der hepatozellulären Vakuolisierung, der zellulären Stressantwort und des durch Apoptose hervorgerufenen Zelltods wurde das Lebergewebe 2-3 Tage in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 5-Mikrometer dicke Schnitte wurden aus den Gewebeblöcken gefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die zytoplasmatische Vakuolenbildung der Hepatozyten wurde in 20 High-Power Feldern ausgezählt und in einem semiquantitativen Score der Kategorie 0 bis 4 eingeteilt. Dabei entsprechen die Kategorien 1 bis 4 dem prozentualen Ausmaß der unter dem Lichtmikroskop (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) sichtbar mit Vakuolen versehenen Zellen. Keine Vakuolen = 0; minimal (weniger als 10% der Hepatozyten) = 1; mild (10-25% der Hepatozyten) = 2; moderat (25-50% der Hepatozyten) = 3; und stark (mehr als 50% der Hepatozyten) = 4.

Zur Untersuchung der Leukozyteninfiltration in das Gewebe wurden neutrophile Granulozyten mit der Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase (CAE) Technik angefärbt. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop durch ein leuchtend-rotes Farbsignal identifiziert. CAE-positive Zellen wurden in 20 konsekutiven High-Power Feldern ausgezählt (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) und in Zahl pro high power field angegeben.

Zur Abschätzung des Glykogengehalts wurden zudem die Schnitte unter Anwendung der Periodic Acid Schiff (PAS) Methode angefärbt. Die semiquantitative Beurteilung des PAS-positiven Gewebes wurde mit folgender Scoreeinteilung durchgeführt: 1 = <30% der Hepatozyten; 2 = 30-70% der Hepatozyten; und 3 = >70% der Hepatozyten.

Um das Ausmaß des durch Apoptose verursachten Zelltodes zu erfassen, wurde die Aktivierung der cleaved Caspase-3 unter Anwendung von indirekten Immunperoxidasetechniken [El-Gibaly et al., 2004] analysiert. Hierbei wurden die deparaffinierten Schnitte mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 2% Ziegenerum inkubiert, um die endogenen Peroxidasen und die unspezifischen Bindungsseiten zu blockieren. Ein polyklonaler anti-cleaved Caspase-3 Antikörper vom Kaninchen (1:100, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany) wurde dabei als Primärantikörper verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein mit Peroxidase markierter goat-anti-rabbit IgG Antikörper. 3,3' Diaminobenzidin (DakoCytomation, Hamburg, Germany) wurde als Chromogen verwendet. Gegengefärbt wurden die Schnitte mit Hämalun. Caspase-3 positive Zellen wurden in 20 high power fields ausgezählt (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) und die Anzahl pro high power field angegeben.

Um die Daten zum apoptotischen Zelltod zu bestätigen, wurde bei den Gewebeproben, die aus der I/R Gruppe, der Sham Kontrollgruppe und der mit Amiodaron vorbehandelten Gruppe stammten, zusätzlich eine TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Untersuchung durchgeführt. Aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken wurden 5 Mikrometer dicke Schnitte auf mit Poly-L-Lysin beschichtete

Objektträger aufgezogen und nach den apoptotisch spezifischen Färbungsansätzen (ApopTag, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) entsprechend den Anleitungen des Herstellers angefärbt. TUNEL positive Zellen wurden in 20 konsekutiven Gesichtsfeldern gezählt (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) und in Prozent zu allen übrigen unter dem Mikroskop sichtbaren Zellen angegeben.

### **3.7 Western Blot Analysen**

Zur Bestimmung der Proteinexpression der Caspase-3 und Hämoxygenase-1 (HO-1) wurde für alle Proteinextraktionen und Western Blot Analysen das Lebergewebe in Lysis Puffer (10mM Tris (pH 7,5), 10mM NaCl, 0,1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 0,2mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)) homogenisiert. Die Lysate wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten mit 16000\*g bei 4°C zentrifugiert. Dem Lysis Puffer, dem noch zusätzlich vor Gebrauch Protease-Inhibitorcocktail (1:100 v/v, Sigma, Taufkirchen, Germany) zugesetzt wurde, diente als Gesamtzellextrakt zur anschließenden Analyse. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Lowry Methode mit Rinderserumalbumin als Standard ermittelt.

30 Mikrogramm Protein pro Tasche wurden jeweils diskontinuierlich auf 10% Natriumdodecyl-sulfatpolyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Polyvinylendifluoridmembran geblottet (BioRad, Munich, Germany). Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit polyklonalen Kaninchen-anti-cleaved Caspase-3 oder Kaninchen-anti-HO-1 Antikörpern (1:800, Cell Signaling Technology) inkubiert. Anschließend wurde ein sekundärer mit Peroxidase konjugierter Esel-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:5000, GE Healthcare, Freiburg, Germany) verwendet. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode auf einen blaulichtempfindlichen Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sichtbar gemacht. Die Signale wurden densitometrisch gemessen und zur Korrektur ungleicher Beladung in Relation zu den beta-Aktin Signalen (Maus monoklonale anti-β-Aktin Antikörper, 1:5000) berechnet.

### **3.8 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll**

Die vorliegende Arbeit bestand aus insgesamt zwei Abschnitten. Im ersten Abschnitt wurde die potentielle protektive Wirkung einer MDDP Präkonditionierung auf die in HTK-Lösung aufbewahrten Lebern zur Verminderung von Konservierungs- und Reperfusionsschäden untersucht. Im zweiten Abschnitt wurden die Auswirkungen einer Vorbehandlung mit Amiodaron auf die Konservierungs- und Reperfusionsschädigung untersucht.

Die Tiere wurden in beiden Versuchsabschnitten in jeweils drei Behandlungs- und Konservierungsgruppen unterteilt. Aus dieser Einteilung ergab sich in beiden Versuchsabschnitten jeweils eine Ischämie-Reperfusionsgruppe (I/R; n=8), eine Sham operierte Kontrollgruppe (Sham; n=8) und eine Gruppe, die den Namen des jeweils vorbehandelten Wirkstoffes trägt, nämlich die MDDP Gruppe (I/R-MDDP; n=8) im ersten Abschnitt und die mit AM vorbehandelte Gruppe (Amiodaron; n=8) im zweiten Abschnitt. In der Ischämie-Reperfusionsgruppe erhielten die Tiere 2,0 ml Trägerflüssigkeit (0,9% NaCl) 10 Minuten bevor die kalte Leberperfusion mit 4°C kalter HTK-Lösung erfolgte. Die Lebern der I/R Gruppe, der I/R-MDDP Gruppe und der Amiodaron Gruppe wurden jeweils über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Bei der Sham operierten Kontrollgruppe (n=8) wurden die unbehandelten Lebern mit 4°C kalter HTK-Lösung perfundiert und anschließend nach kurzer Lagerung in HTK-Lösung direkt reperfundiert.

### **3.9 MDDP Präkonditionierung**

Die MDDP Gabe im ersten Teil der Arbeit erfolgte 30 Minuten vor Beginn der kalten Perfusion mit der HTK-Konservierungslösung, indem 50 mg/kg KG Curcumin (Sigma Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Germany), gelöst in 0,33 ml DMSO [Shen SQ et al., 2007] und 5 mg/kg KG Simvastatin (SimvaHEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Germany), gelöst in 0,67 ml 100% Ethanol [Lai IR et al., 2008] intragastral unter Verwendung einer 0,45\*13 mm Kanüle verabreicht wurden (Tabelle 1). MDDP beinhaltete zusätzlich die intraperitoneale Gabe von 150 mg/kg KG N-Acetylcystein (Fluimucil®, Pierre Fabre Pharma, Freiburg, Germany), gelöst in 0,67 ml 0,9% NaCl Lösung [Montero EF et al., 2005], 3000 I.E./kg KG Erythropoietin (Epoetin alfa HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Germany) [Schmeding M et al., 2007], 50 mg/kg KG Pentoxifyllin (Trental®, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), gelöst in 0,67 ml 0,9% NaCl [Nishizawa H et al., 1997; El-Ghoneimi A et al., 2007] und 10 mg/kg KG Melatonin (Sigma Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Germany), gelöst in 0,67 ml 20% Ethanol [Kim SH et al., 2008; Zhang SJ et al., 2006], 30 Minuten bevor die kalte Perfusion erfolgte (Tabelle 1). Die MDDP Gabe wurde schließlich durch intravenöse Gabe von 100 mg/kg KG (300mM) Glyzin (Sigma Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Germany), gelöst in 0,67 ml 0,9% NaCl [Duenschede F et al., 2006] und 5 mg/kg KG Methylprednisolon Urbason®, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), gelöst in 0,67 ml 0,9% NaCl Lösung [Chimalakonda AP et al., 2003] über die Portalvene 10 Minuten vor Durchführung der kalten HTK-Perfusion (Tabelle 1) vervollständigt.



Substanzen	i.g.	i.p.	i.v.	Dosierung	Applikationszeitpunkt
<b>Curcumin</b>	x			50 mg/kg KG	30min
<b>Simvastatin</b>	x			5 mg/kg KG	30min
<b>N-Acetylcystein</b>		x		150 mg/kg KG	30min
<b>Erythropoietin</b>		x		3000 IU/kg KG	30min
<b>Pentoxifyllin</b>		x		50 mg/kg KG	30min
<b>Melatonin</b>		x		10 mg/kg KG	30min
<b>Glyzin</b>			x	100 mg/kg KG	10min
<b>Methylprednisolon</b>			x	5 mg/kg KG	10min

**Tabelle 1** Die Vorbehandlung mit MDDP wurde 10-30 Minuten vor Beginn der kalten Perfusion mit der HTK-Konservierungslösung durchgeführt. Dabei wurden Curcumin und Simvastatin intragastral (i.g.) appliziert, während N-Acetylcystein, Erythropoietin, Pentoxifyllin, Melatonin intraperitoneal (i.p.) und Glyzin sowie Methylprednisolon intravenös (i.v.) über die Pfortader verabreicht wurden.

### 3.10 Amiodaron Präkonditionierung

Im zweiten Versuchsabschnitt erhielten die Ratten in der mit AM vorbehandelten Gruppe 5 mg AM (Cordarex®, Sanofi Aventis, Frankfurt, Germany) /kg KG über einen Karotiskatheter 10 Minuten bevor die Leberperfusion mit der 4°C kalten HTK-Lösung erfolgte. Die verwendete Dosierung entsprach jener, die vom Hersteller empfohlen wird und welche in klinischen Untersuchungen verwendet wurde, um eine antiarrhythmische Wirkung zu erzielen [Roy D et al., 2000]. Mit dieser Dosierung wurde eine Serumkonzentration des AM von  $4,39 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$  erreicht. Laut Information des Herstellers befindet sich diese Konzentration innerhalb des therapeutischen Fensters und unterhalb der Toxizitätsschwelle von  $5 \mu\text{g/ml}$ , die für diese Substanz angegeben ist.

### **3.11 Statistische Auswertung**

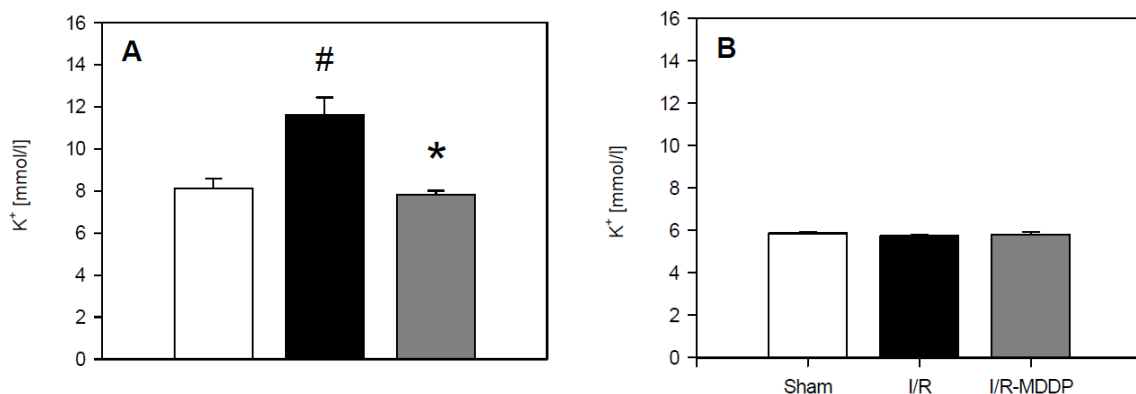
Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Der statistische Vergleich zwischen 2 Gruppen wurde mit einem gepaarten T-Test durchgeführt. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden über eine One-Way Analysis of Variance (ANOVA) berechnet, gefolgt von einem paarweisen Dunnett post-hoc Test unter Verwendung des statistischen Software Packets SigmaStat (Jandel Scientific, CA, USA). Die post-hoc Analyse beinhaltete die Korrektur des alpha Fehlers nach Bonferroni zur Kompensation multipler Analysen. Signifikante Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 MDDP Präkonditionierung

#### 4.1.1 Metabolische Parameter und Leberschädigung

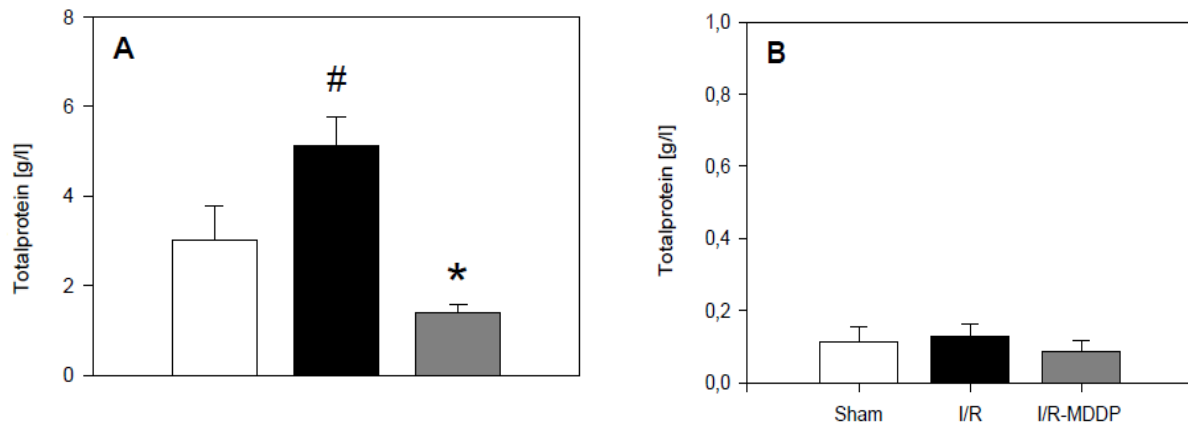
I/R verursachten einen signifikanten Anstieg des Kaliums ( $K^+$ ) und der Gesamtproteine (GP) im ersten Effluat nach einminütiger Reperfusion im Vergleich zu den Sham-Kontrollen. Hierbei ist von Interesse, dass MDDP diesen Anstieg von  $K^+$  und GP vollständig verhindern konnte. So wurden in der MDDP Gruppe Werte gemessen, die mit denen der Sham-Kontrollen vergleichbar waren (Abb. 1A und 2A). Nach 60-minütiger Reperfusion erfolgte bei allen Lebern, die einer kalten ischämischen Aufbewahrung ausgesetzt waren, eine Freisetzung von  $K^+$  und Proteinen, die in ihrem Ausmaß mit der Freisetzung der nicht ischämischen Sham-Kontrollen vergleichbar war (Abb. 1B und 2B). Die Bestimmung des pH-Werts ergab keine grundlegenden Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen.



**Abbildung 1.** Die Kaliumkonzentration ( $K^+$ ) des Effluats zum Zeitpunkt 1min (A) und 60min (B) Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HT K-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, <sup>\*</sup>p<0,05 vs. I/R.

Die Analysen zu ASAT, ALAT und LDH, welche als Hinweis für parenchymatöse Schädigung gelten, ergaben einen 5- bis 10-fachen Anstieg im ersten Effluat bei den I/R Lebern im Vergleich zur Sham Kontrollgruppe (Tabelle 2). MDDP konnte diese Zunahme der hepatozellulären Enzymfreisetzung fast vollständig verhindern, so dass sich die Werte aus der MDDP Gruppe nicht signifikant von denen der Sham Kontrollgruppe unterschieden (Tabelle 2). Nach 30- und 60-minütiger Reperfusion wurde im Vergleich zu den Kontrollen aus der Sham Gruppe geringfügig höhere Enzymwerte bei den I/R Lebern und I/R-MDDP Lebern gemessen. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tabelle 2).

Die Messung des Galleflusses diente als Indikator der exkretorischen Funktion der Leber. Nach 60 Minuten Reperfusion produzierten die Sham-Kontrollen einen Gallefluss von  $0,23 \pm 0,05 \mu\text{g Lebergewebe} \cdot \text{min}$ . Im Vergleich hierzu ergab sich bei den I/R Lebern eine Galleflussmenge von  $0,17 \pm 0,03 \mu\text{g Lebergewebe} \cdot \text{min}$ . Unter MDDP Vorbehandlung konnte ein Gallefluss von  $0,22 \pm 0,05 \mu\text{g Lebergewebe} \cdot \text{min}$  gemessen werden.



**Abbildung 2.** Die Gesamtproteinkonzentration des Effluats, die den Verlust an Proteinen zum Zeitpunkt 1 min **(A)** und 60 min **(B)** Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung kennzeichnet. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; #p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

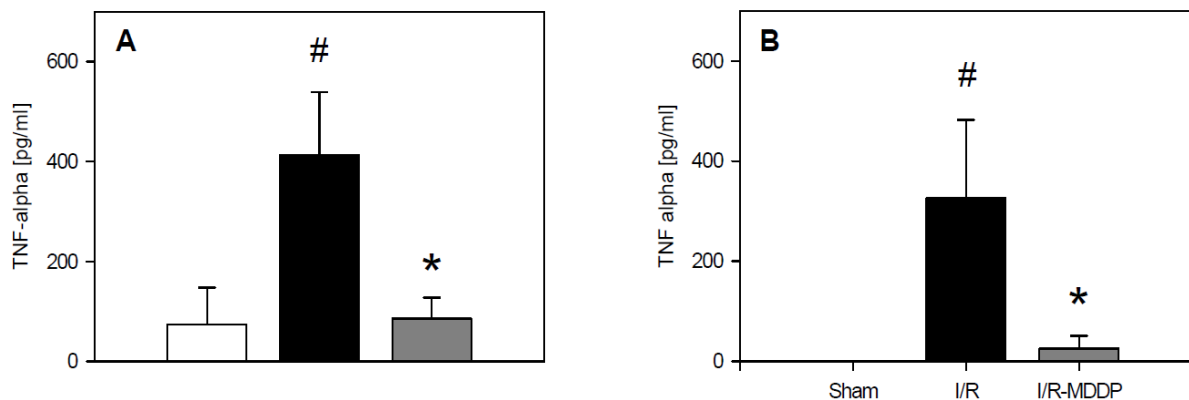
Parameter (U/l)	1min	30min	60min
<b>ASAT</b>			
Sham	$31,8 \pm 7,6$	$0,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,4$
I/R	$220,6 \pm 40,9^{\#}$	$7,7 \pm 2,2^{\#}$	$9,0 \pm 4,6$
I/R-MDDP	$55,1 \pm 10,6^*$	$7,8 \pm 1,7^{\#}$	$9,6 \pm 4,7$
<b>ALAT</b>			
Sham	$13,0 \pm 4,0$	$0,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,4$
I/R	$138,0 \pm 32,2^{\#}$	$2,8 \pm 1,5$	$1,4 \pm 0,7$
I/R-MDDP	$27,9 \pm 5,9^*$	$2,4 \pm 0,9$	$2,2 \pm 1,0$
<b>LDH</b>			
Sham	$239,9 \pm 95,7$	$1,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,5$
I/R	$994,0 \pm 158,9^{\#}$	$5,3 \pm 2,0$	$3,5 \pm 1,3$
I/R-MDDP	$476,0 \pm 156,6^*$	$6,8 \pm 1,3$	$4,9 \pm 1,1$

**Tabelle 2.** Die Freisetzung der Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT) und Laktatdehydrogenase (LDH) im Effluat zum Zeitpunkt 1 Minute, 30 Minuten und 60 Minuten

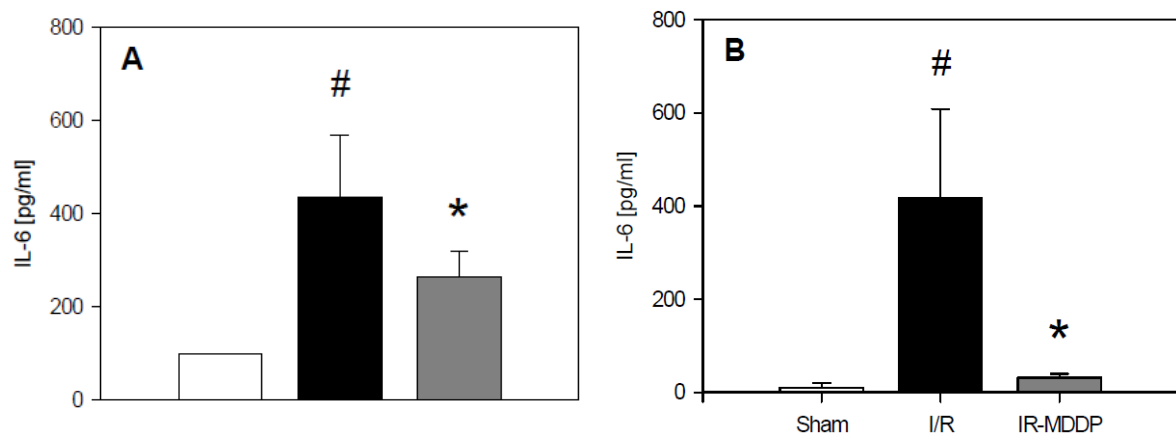
Reperfusion nach 24 h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Spendertiere wurden mit MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) vorbehandelt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24-stündigen kalten Konservierung ausgesetzt wurden, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

#### 4.1.2 Zytokinfreisetzung

Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-6 in das Effluat während der postischämischen Reperfusion wurde mittels ELISA Technik untersucht. Die kalte Aufbewahrung der Lebern über 24 Stunden verursachte eine signifikante Zunahme der TNF-alpha und IL-6 Konzentrationen im ersten Effluat nach einer Minute, welche auch über den gesamten Zeitraum der 60-minütigen Reperfusion erhöht blieb (Abb. 3 und 4). Von Interesse ist hierbei, dass nach einminütiger Reperfusion die MDDP Vorbehandlung den Anstieg von TNF-alpha verhindern und die Menge an freigesetztem IL-6 signifikant reduzieren konnte. Auch nach 60-minütiger Reperfusion ergaben die Zytokinmessungen im Effluat der I/R-MDDP Gruppe niedrige Werte, die sich von den Zytokinwerten aus der Sham Kontrollgruppe nicht signifikant unterschieden (Abb. 3 und 4).



**Abbildung 3.** Die Konzentration von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) im Effluat zum Zeitpunkt 1min (A) und 60min (B) Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

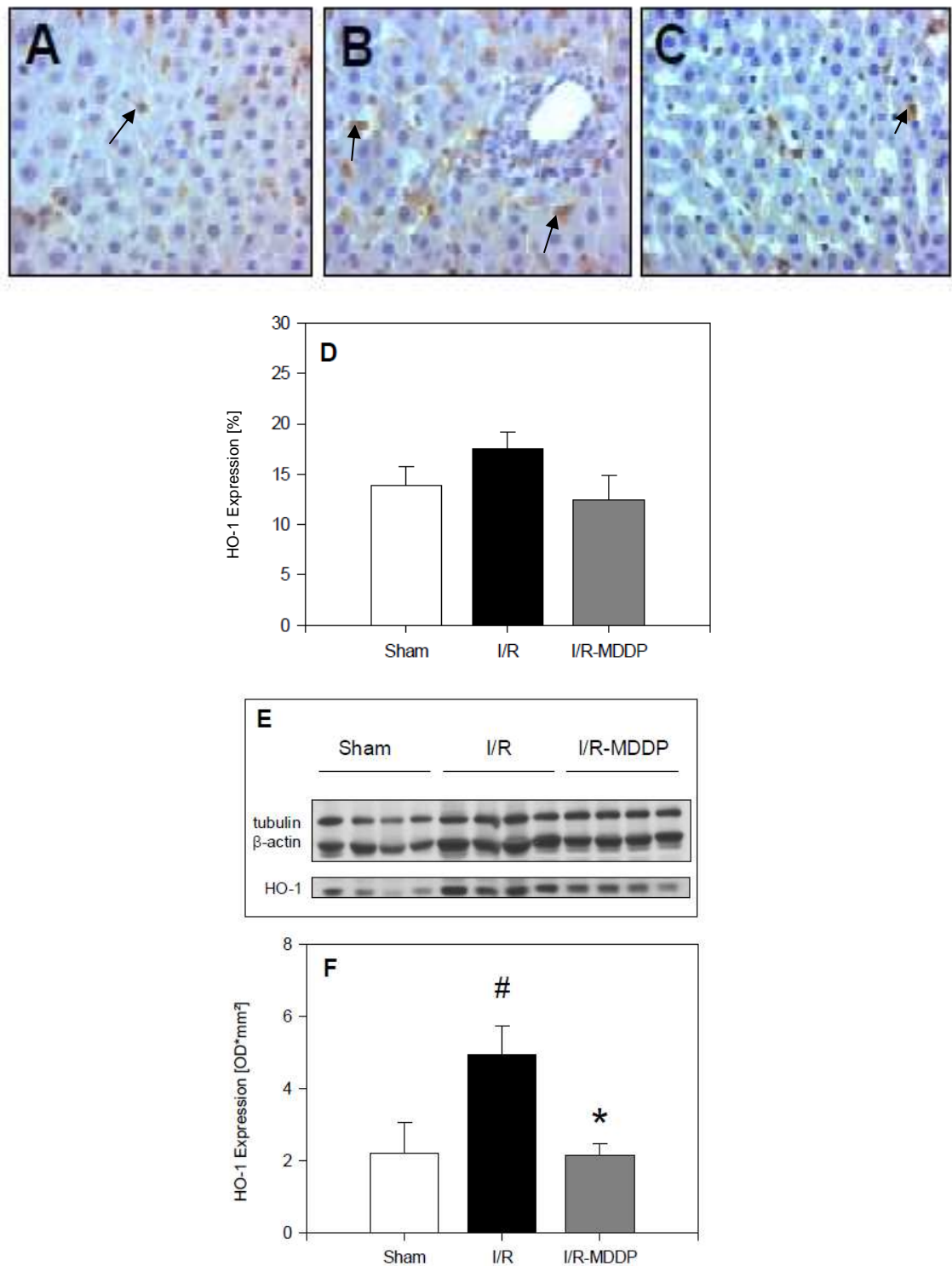


**Abbildung 4.** Die Konzentration vom Interleukin-6 im Effluat zum Zeitpunkt 1min (A) und 60min (B) Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HT K-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, <sup>\*</sup>p<0,05 vs. I/R.

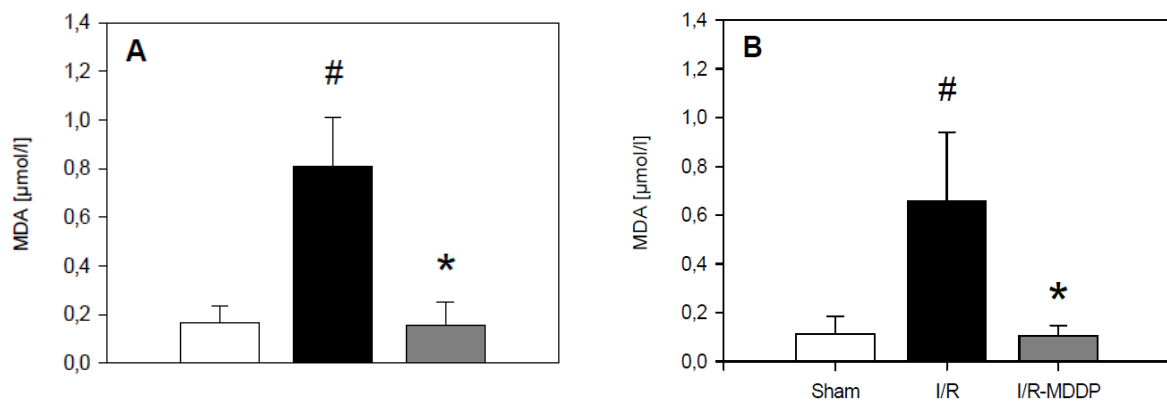
#### 4.1.3 Stressantwort und Lipidperoxidation

HO-1 wurde als ein Indikator für zellulären Stress nach kalter Ischämie und Reperfusion betrachtet. Immunhistochemische Untersuchungen nach 60-minütiger Reperfusion ergaben einen geringen, allerdings nicht signifikanten Anstieg der Zahl HO-1 positiver Zellen nach I/R im Vergleich zu den nicht-ischämischen Kontrollen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den I/R-MDDP Lebern dieser Anstieg vollständig aufgehoben (Abb. 5A-5D). Um das Ausmaß der HO-1 Expression näher zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben einen signifikanten Anstieg um das 2,5-fache nach I/R verglichen mit der Kontrollgruppe, während die Stressantwort bei den MDDP Lebern sich nicht wesentlich von der Stressantwort der nicht-ischämischen Kontrollorgane unterschied (Abb. 5E und 5F).

Die Bildung von MDA gilt als ein Indikator für Lipidperoxidation und Membranzerfall. Im ersten Effluat nach einminütiger Reperfusion wurde bei den I/R Lebern eine signifikante Zunahme der MDA Konzentration um nahezu das 5-fache im Vergleich zu den Sham-Kontrollen beobachtet, die auch bis zum Ende des 60-minütigen Beobachtungszeitraums stark erhöht blieb (Abb. 6). Die Verabreichung der MDDP Substanzen vor der 24-stündigen kalten Ischämie zeigte sich erfolgreich die MDA Zunahme über die gesamte Dauer der Reperfusion zu verhindern (Abb. 6).



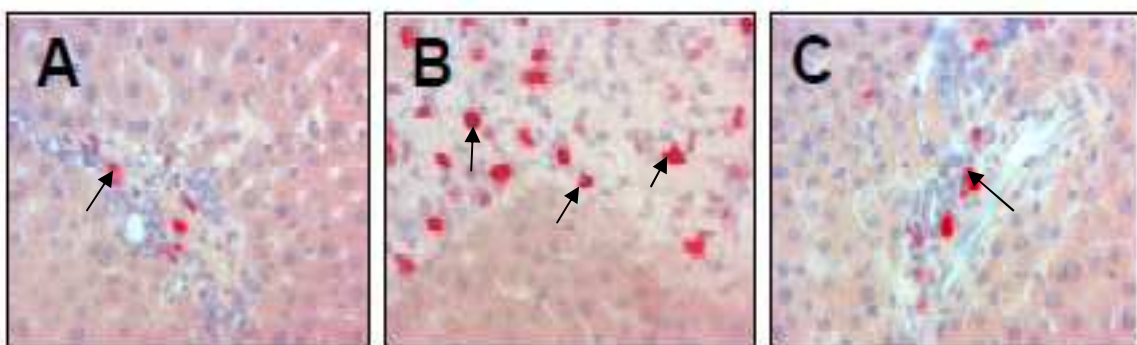
**Abbildung 5.** Hämoxygenase-1 (HO-1) Expression nach 60min Reperfusion bei Lebern, die 24h in 4°C kalter HTK-Lösung konserviert wurden (**A-D**, Immunhistochemie; **E** und **F**, Western Blot). Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP, **C**) oder NaCl (I/R, **B**) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham, **A**). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup> $p<0,05$  vs. Sham, <sup>\*</sup> $p<0,05$  vs. I/R. Vergrößerung (**A-C**): x120



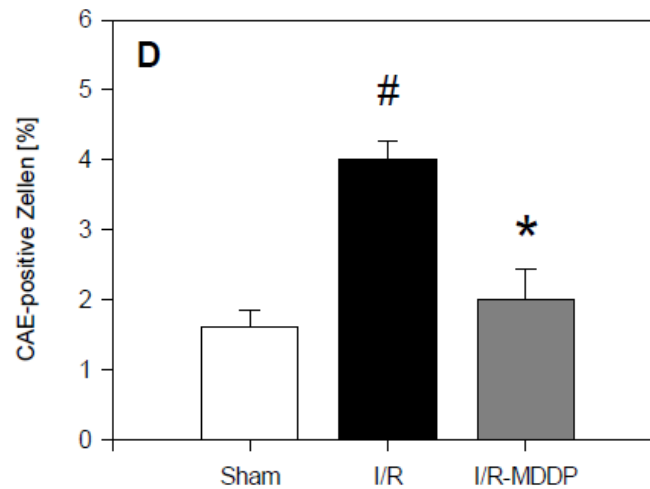
**Abbildung 6.** Die Konzentration an Malondialdehyd (MDA) im Effluat zum Zeitpunkt 1min (A) und 60min (B) Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP) oder NaCl (I/R) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, <sup>\*</sup>p<0,05 vs. I/R.

#### 4.1.4 Leukozyteninvasion

Nach 60-minütiger Reperfusion zeigten die mit Kochsalz behandelten I/R Lebern eine deutlich erhöhte Anzahl infiltrierter Leukozyten im Gewebe. Die Vorbehandlung der Lebern mit MDDP ermöglichte die vollständige Verhinderung der durch I/R hervorgerufenen Zunahme der Invasion von Leukozyten in das Gewebe (Abb. 7).





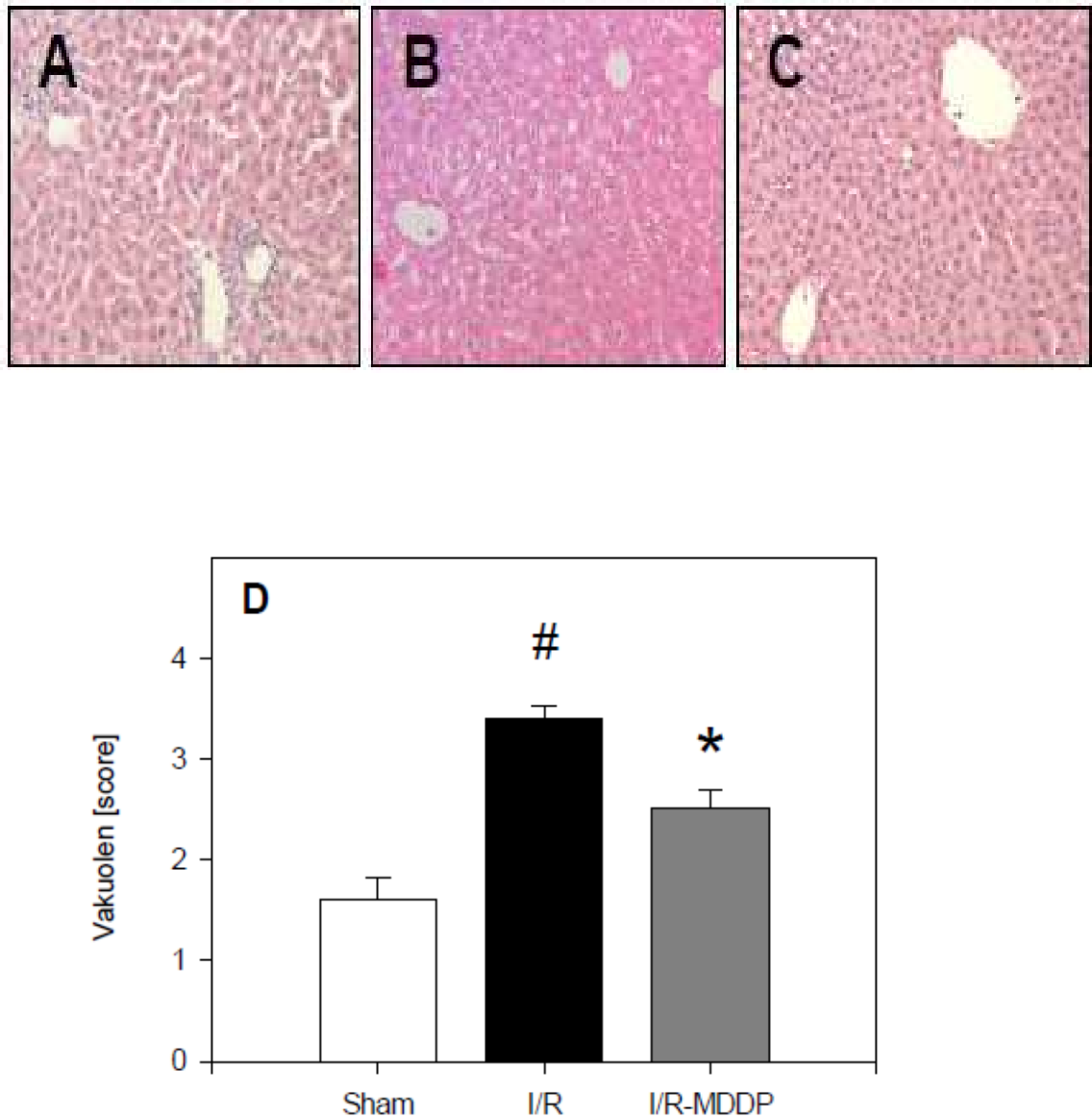


**Abbildung 7.** Intrahepatische Leukozyteninfiltration (AS-D Chloracetatesterasefärbung) zum Zeitpunkt 60min Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP, **C**) oder NaCl (I/R, **B**) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham, **A**). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; #p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R. Vergrößerung (**A-C**): x120. Infiltrierte Leukozyten sind mit Pfeilen markiert (A-C).

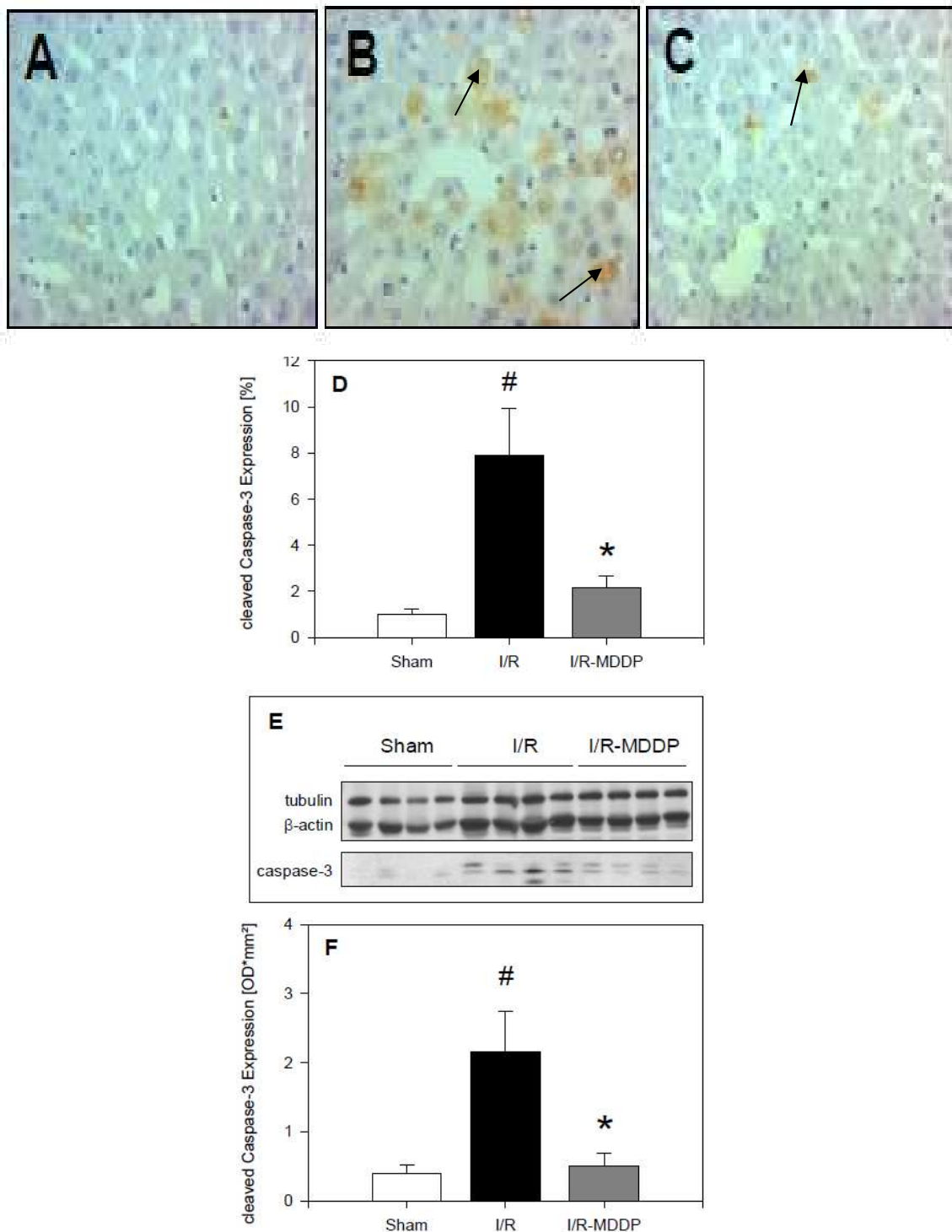
#### 4.1.5 Histomorphologie und apoptotischer Zelltod

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitte zeigten einen starken Anstieg der Vakuolisierung in den Hepatozyten nach I/R, verglichen mit den Sham-Kontrollen, was hinweisgebend für hypoxische parenchymatöse Schädigungen ist. MDDP war in der Lage, die Vakuolisierung signifikant zu reduzieren. Obwohl der Vakuolisierungsgrad nach MDDP Gabe noch immer höher ausfiel als der bei der Sham Kontrollgruppe, erwies sich dieser Unterschied nicht als statistisch signifikant (Abb. 8).

Außerdem zeigte sich in der Immunhistochemie und den Western Blot Untersuchungen eine signifikante Zunahme der cleaved Caspase-3 Expression bei den Kochsalz-behandelten I/R Lebern im Vergleich zu den Sham-Kontrollen. Von Interesse ist dabei, dass MDDP vor der 24-stündigen kalten Konservierung den Anstieg der cleaved Caspase-3 vollständig aufhob, was die Schutzfunktion gegenüber dem apoptotischen Zelltod belegt (Abb. 9).



**Abbildung 8.** Zytoplasmatische hepatozelluläre Vakuolenbildung (Hämatoxylin-Eosin Färbung) zum Zeitpunkt 60min Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP, **C**) oder NaCl (I/R, **B**) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham, **A**). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; # $p<0,05$  vs. Sham, \* $p<0,05$  vs. I/R. Vergrößerung (**A-C**):  $\times 120$



**Abbildung 9.** Intrahepatische Cleaved Caspase-3 Expression zum Zeitpunkt 60min nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung (**A-D**, Immunohistochemie; **E** und **F**, Western Blot). Bei Spendertieren wurde eine MDDP (I/R-MDDP, **C**) oder NaCl (I/R, **B**) Behandlung durchgeführt. Die Lebern der unbehandelten Tiere, die keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Shamkontrollgruppe (Sham, **A**). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup> $p<0,05$  vs. Sham, <sup>\*</sup> $p<0,05$  vs. I/R. Vergrößerung (**A-C**): x120. Cleaved Caspase-3-positive Zellen sind mit Pfeilen markiert.

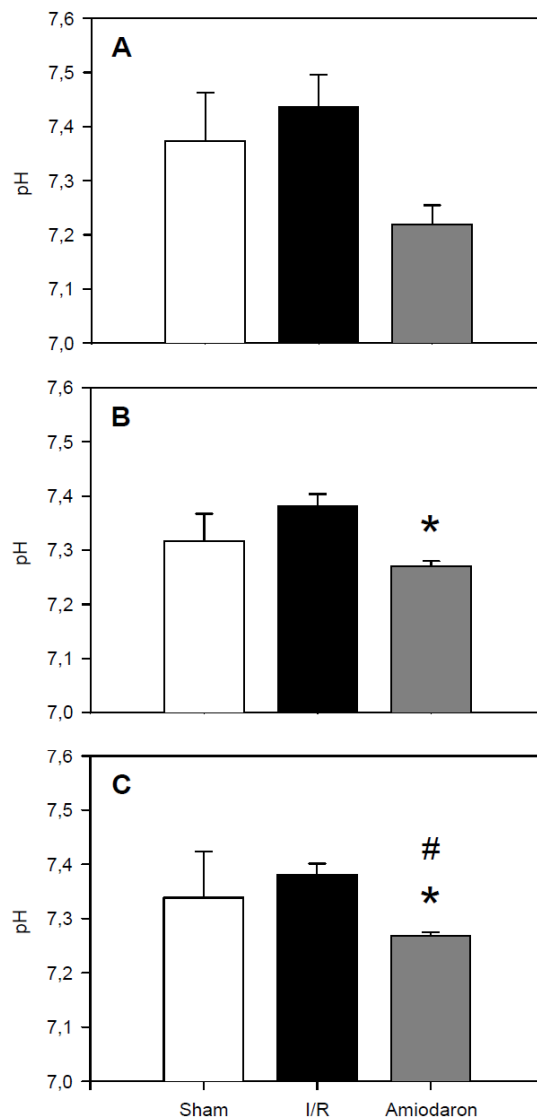
## 4.2 Amiodaron Präkonditionierung

### 4.2.1 Hämodynamische und metabolische Parameter

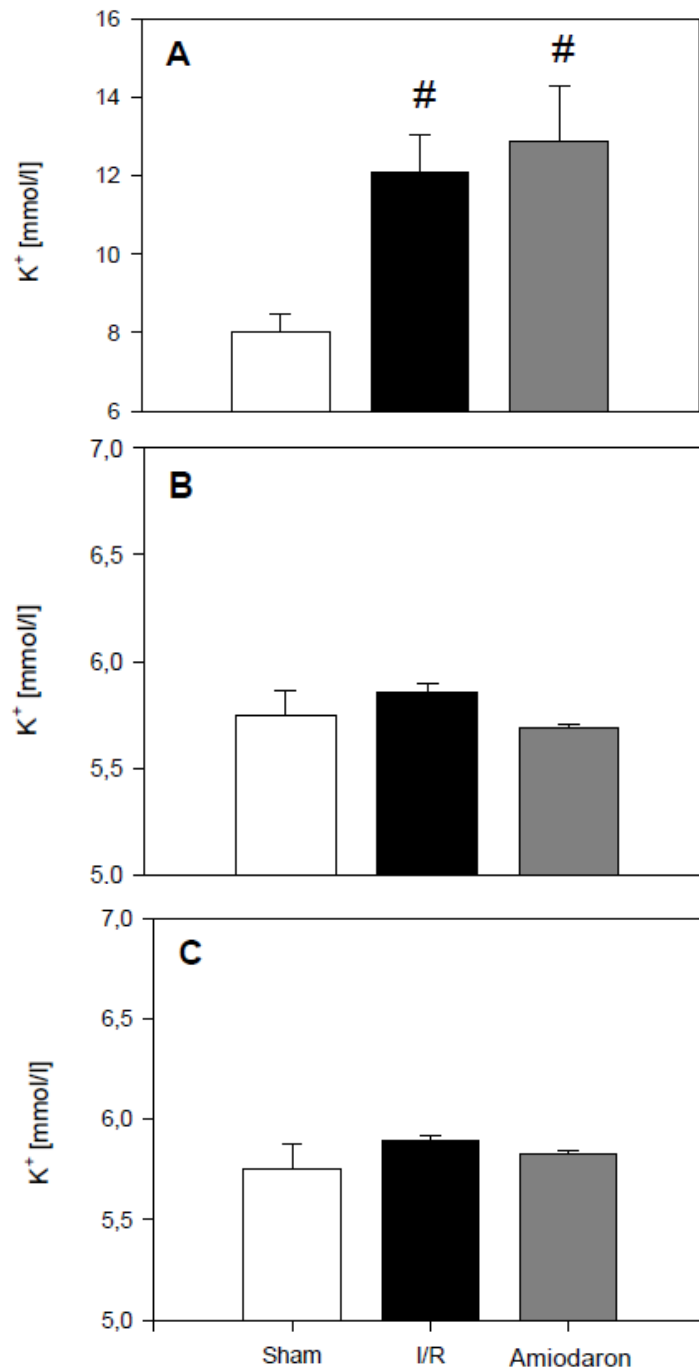
Über den einstündigen Reperusionszeitraum verminderte sich der portalvenöse Druck von 5-12 mmHg auf 4-8 mmHg ohne signifikante Unterschiede zwischen den AM, I/R und Sham Lebern. Während der ersten Minute nach Beginn der Reperfusion war der Sauerstoffverbrauch bei den mit AM vorbehandelten Lebern im Vergleich zu den I/R- und Sham-Kontrollen signifikant erhöht. Bei allen Gruppen sank die pCO<sub>2</sub> Differenz während des einstündigen Reperusionszeitraums (Tabelle 3). Interessant ist dabei, dass die AM Vorbehandlung eine signifikante Verminderung des pH-Werts nach 30 und 60 Minuten, verglichen mit den Sham-Kontrollen bewirkte ( $p < 0,05$ ; Abb. 10). Außerdem verursachte die 24-stündige kalte Ischämie (in der IR Gruppe und AM Gruppe) einen signifikanten Anstieg der Kaliumkonzentration im ersten Effluat im Vergleich zu den Sham-Kontrollen (Abb. 4). Während der späteren Reperusionsperiode hingegen fiel die Kaliumkonzentration auf Werte ab, die vergleichbar zu denen der Shamgruppe waren ( $p < 0,05$ ; Abb. 11).

Parameter	1 Minute	30 Minuten	60 Minuten
Portalvenöser Druck (mmHg)			
Sham	10,00 ± 2,26	8,71 ± 1,52	5,43 ± 1,27
Ischämie/Reperfusion	9,72 ± 2,63	7,50 ± 2,95	7,17 ± 2,52
Amiodaron	8,00 ± 1,00	6,38 ± 1,35	5,13 ± 1,16
O <sub>2</sub> Verbrauch (mmHg/min*g Lebergewebe)			
Sham	0,32 ± 0,13	0,51 ± 0,10	0,44 ± 0,11
Ischämie/Reperfusion	0,44 ± 0,15	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,02
Amiodaron	0,65 ± 0,12* <sup>#</sup>	0,40 ± 0,03	0,41 ± 0,04
pCO <sub>2</sub> Differenz (mmHg/g Lebergewebe)			
Sham	1,50 ± 0,42	1,15 ± 0,15	0,85 ± 0,12
Ischämie/Reperfusion	1,80 ± 0,34	0,94 ± 0,17	0,81 ± 0,12
Amiodaron	1,78 ± 0,43	0,88 ± 0,10	0,74 ± 0,06

**Tabelle 3.** Hämodynamische und metabolische Parameter zum Zeitpunkt 1, 30 und 60 Minuten Reperfusion nach 24h Konservierung in 4°C kalter HT K-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron oder Kochsalzlösung (Ischämie/Reperfusion) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24-stündigen kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. Sham, \* $p < 0,05$  vs. I/R.



**Abbildung 10.** pH des Reperfusionseffluats zum Zeitpunkt 1min (A), 30min (B) und 60min (C) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; #p<0.05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

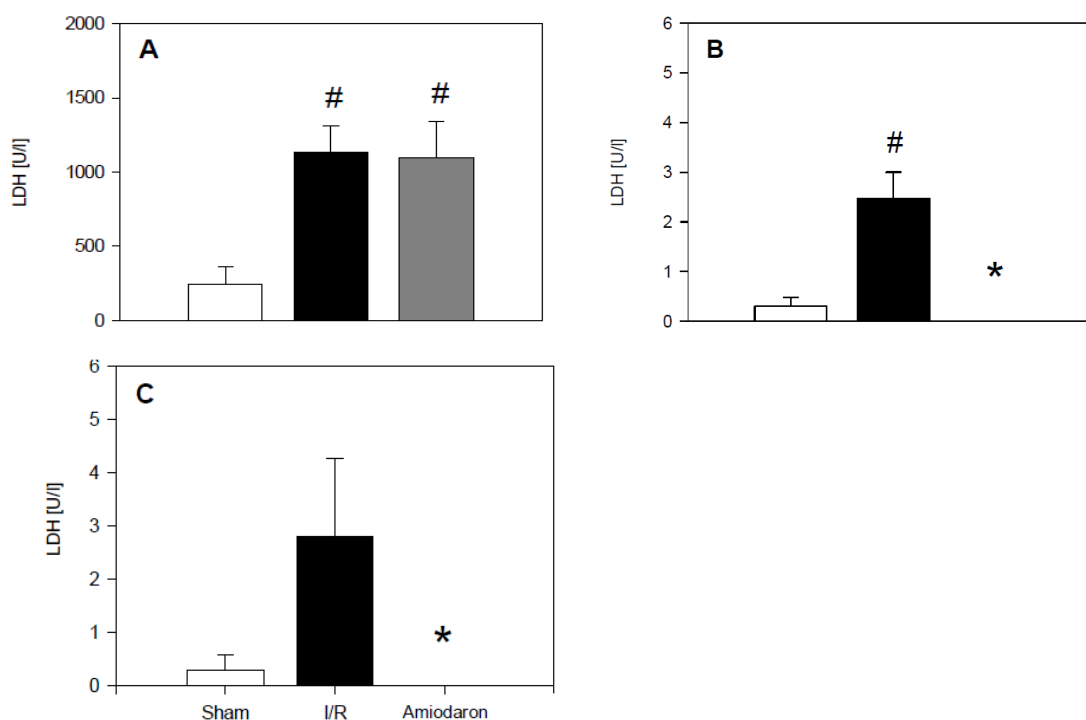


**Abbildung 11.** Kaliumkonzentration ( $K^+$ ) im Reperfusionseffluat zum Zeitpunkt 1min (A), 30min (B) und 60min (C) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung. nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; # $p < 0,05$  vs. Sham.

#### 4.2.2 Ischämische Parameter und Leberschädigung

Wie zu erwarten zeigten sich die LDH Konzentrationen während der Reperfusion deutlich erhöht gegenüber den Sham-Kontrollen ( $p < 0,05$ ; Abb. 12). Die Vorbehandlung mit AM konnte den LDH Anstieg im ersten Effluat nicht verhindern, was auf einen unbeeinflussten Konservierungsschaden hindeutet (Abb. 12). Dennoch konnte AM im weiteren Verlauf die Hepatozyten vor Reperfusionsschäden schützen, was sich in den LDH Konzentrationen widerspiegelte, die nach 30 und 60 Minuten Reperfusion auf Werte abfiel, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen ( $p < 0,05$ ; Abb. 12).

Ebenso verminderte AM die Aktivitäten der ASAT und ALAT erheblich im Vergleich zu denen der unbehandelten Lebern, welche ebenfalls einer kalten Ischämie ausgesetzt waren, obgleich die Unterschiede gegenüber der I/R Gruppe zu keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikant waren (Tabelle 4). Die Untersuchungen des Gesamtproteins ergaben keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums (Tabelle 4).



**Abbildung 12.** Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Effluat zum Zeitpunkt 5s (A), 30min (B) und 60min (C) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; # $p < 0,05$  vs. Sham, \* $p < 0,05$  vs. I/R.

Parameter	1 Minute	30 Minuten	60 Minuten
ASAT (U/l)			
Sham	31,81 ± 7,56	0,22 ± 0,15	0,62 ± 0,35
Ischämie/Reperfusion	182,89 ± 39,95 <sup>#</sup>	7,67±2,24 <sup>#</sup>	7,00±3,72
Amiodaron	133,00 ± 36,58 <sup>#</sup>	0,50 ± 0,27*	0,63 ± 0,50
ALAT (U/l)			
Sham	13,00 ± 4,01	0,56 ± 0,24	0,56 ± 0,44
Ischämie/Reperfusion	138,00 ± 32,17 <sup>#</sup>	2,78 ± 1,52	7,89 ± 6,54
Amiodaron	102,75 ± 28,11 <sup>#</sup>	1,38 ± 0,38	1,00 ± 0,50
Totalprotein (g/dl)			
Sham	3,16 ± 0,93	0,04 ± 0,02	0,14 ± 0,05
Ischämie/Reperfusion	5,12 ± 0,66	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,03
Amiodaron	6,41 ± 1,20	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,02

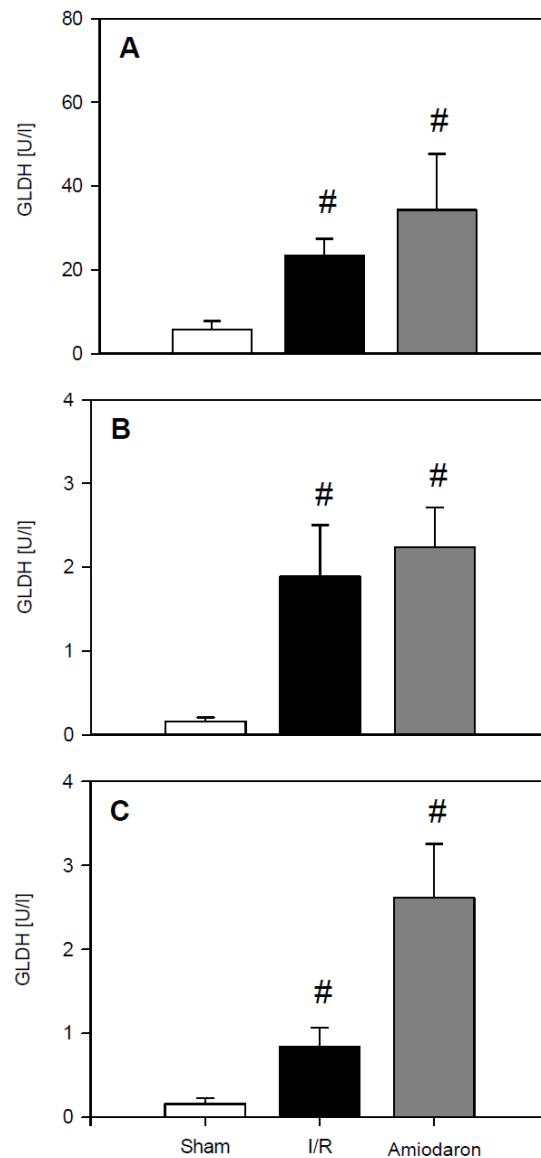
**Tabelle 4.** Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT) und Totalprotein (TP) zum Zeitpunkt 5 Sekunden, 30 Minuten und 60 Minuten Reperfusion der Lebern mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron oder Kochsalzlösung (Ischämie/ Reperfusion) vorbehandelt und die Lebern über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24-stündigen kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

#### 4.2.3 Mitochondriale Schädigung und Lipidperoxidation

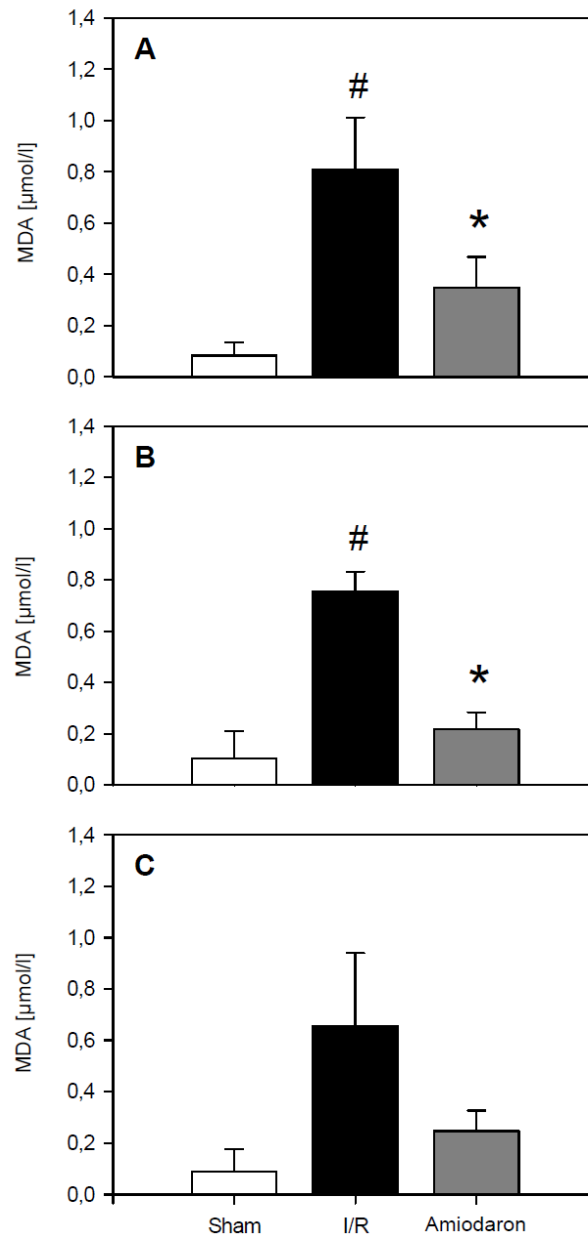
Die GLDH Aktivität diente als Indikator für das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung. I/R verursachten einen Anstieg der GLDH Aktivität, welche über den gesamten Reperfusionszeitraum signifikant gegenüber der der Sham-Kontrollen erhöht war (p<0,05; Abb. 13). Die Vorbehandlung mit AM führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der GLDH Aktivität. Bemerkenswert war dabei, dass am Ende der Reperfusionsperiode die GLDH Aktivität nach Vorbehandlung mit AM sogar um mehr als das dreifache im Vergleich zur I/R Gruppe erhöht war (p<0,05; Abb. 13).

I/R verursachte zusätzlich einen signifikanten Anstieg der MDA Konzentration innerhalb der ersten 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion im Vergleich zur Sham-Kontrolle (p<0,05; Abb. 14). Die AM Vorbehandlung reduzierte das Ausmaß der Lipidperoxidation signifikant (p<0,05; versus I/R) auf das Niveau von den Sham behandelten Tieren nach 30- und 60-minütiger Reperfusion (Abb.14).





**Abbildung 13.** Die Aktivität der Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Effluat zum Zeitpunkt 5s (**A**), 30min (**B**) und 60min (**C**) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrollen (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.



**Abbildung 14.** Die Konzentration von Malondialdehyd (MDA) im Effluat nach 5s (**A**), 30min (**B**) und 60min (**C**) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrollen (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup> $p<0,05$  vs. Sham, <sup>\*</sup> $p<0,05$  vs. I/R.

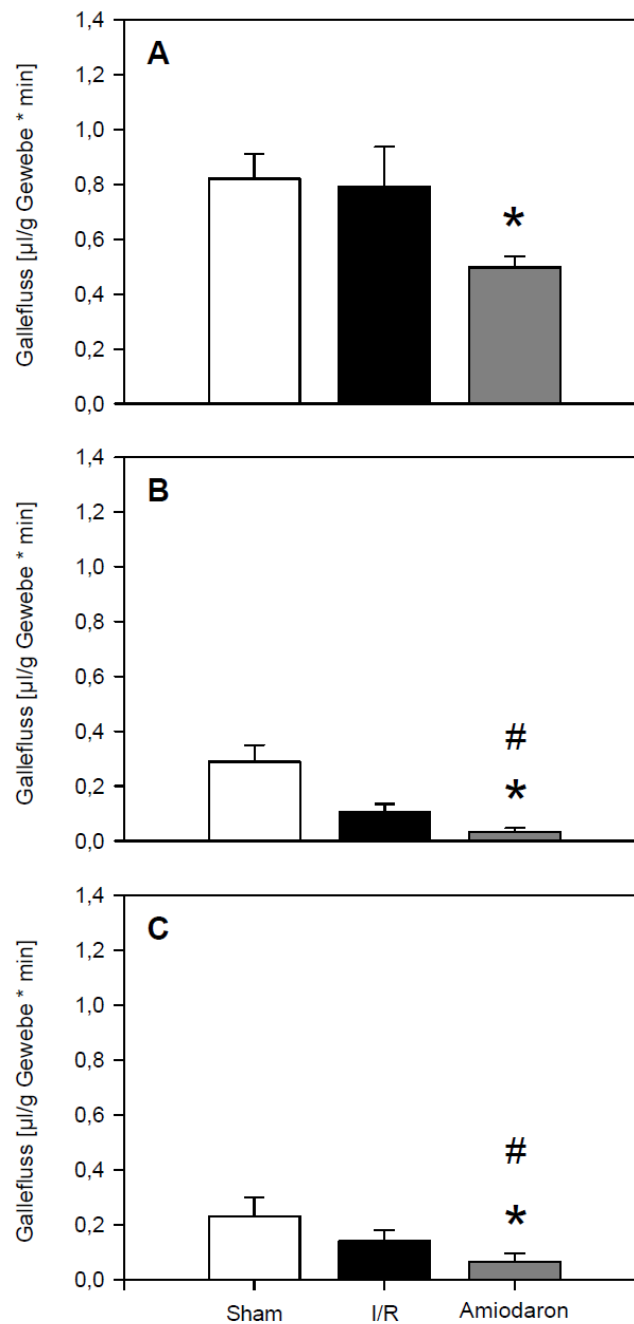
#### 4.2.4 Gallefluss und Lebergewicht

Der Gallefluss wurde als ein Indikator für die exkretorische Leberfunktion gemessen. I/R bewirkte eine Verringerung des Galleflusses nach 30 und 60 Minuten Reperfusion gegenüber Sham Kontrollen. Diese Reduktion war jedoch nicht signifikant (Abb. 15). Dagegen war nach AM Vorbehandlung der Gallefluss bereits während der Organentnahme signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ; Abb. 15A). Nach 30 und 60-minütiger Reperfusion sank der Gallefluss weiter auf Werte nahe Null ab, was signifikant niedriger als bei den Lebern der I/R Gruppe und denen der Shamkontrollgruppe war ( $p < 0,05$ ; Abb. 15B,C).

Das Gewicht der Lebern der I/R Gruppe unterschied sich nicht wesentlich von dem der Sham behandelten Tiere, weder nach flushing und Entnahme noch nach der 60-minütigen Reperfusion (Tabelle 5). Die mit AM vorbehandelten Lebern zeigten ein signifikant vermindertes Gewicht bereits nach flushing und Entnahme im Vergleich zu den Sham-Kontrollen ( $p < 0,05$ ) und ebenso nach 24-stündiger kalter Konservierung ( $p < 0,05$ ; Tabelle 5). Nach 60-minütiger Reperfusion war das Gewicht der mit AM vorbehandelten Lebern vergleichbar mit dem Gewicht, das nach Organentnahme gemessen wurde.

	Sham	Ischämie/Reperfusion	Amiodaron
Lebergewicht nach flushing [g]	12,35 ± 0,29	12,08 ± 0,30	10,81 ± 0,31 <sup>#</sup>
Lebergewicht nach Konservierung [g]		12,99 ± 0,37	11,54 ± 0,40*
Lebergewicht nach Reperfusion [g]	11,72 ± 0,54	12,09 ± 0,39	10,83 ± 0,43

**Tabelle 5.** Das Lebergewicht nach flushing mit HTK, nach 24-stündiger Konservierung in HTK-Lösung und nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron oder Kochsalzlösung (Ischämie/Reperfusion) vorbehandelt und die Lebern über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24-stündigen kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. Sham, \* $p < 0,05$  vs. I/R.



**Abbildung 15.** Gallefluss während der Explantationsdurchführung in vivo (A), sowie nach 30min (B) und 60min (C) der Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24 h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; #p<0,05 vs. Sham, \*p<0,05 vs. I/R.

#### 4.2.5 Histologie der Lebern

Im Vergleich zu den Sham-Kontrollen konnte bei den Lebern der I/R Gruppe ein signifikanter Anstieg der Vakuolenbildung in den Hepatozyten beobachtet werden ( $p < 0,05$ ; Tabelle 6). Bei den mit AM vorbehandelten Lebern zeigte sich die Vakuolisierung ebenfalls gegenüber den Sham Kontrollen ( $p < 0,05$ ) signifikant erhöht (Tabelle 6). Verglichen mit den I/R Kontrollen konnte bei den mit AM vorbehandelten Lebern eine geringfügig höhere Vakuolisierung festgestellt werden, die jedoch nicht signifikant war (Tabelle 6).

Die PAS Färbung zeigte einen deutlich reduzierten Glykogengehalt der I/R Lebern im Vergleich zu Sham-Kontrollen ( $p < 0,05$ ; Tabelle 6). Interessanterweise veränderte die AM Vorbehandlung den hepatozellulären Glykogengehalt nicht, verglichen mit den unbehandelten Lebern, die einer 24-stündigen kalten Ischämie und 60 Minuten dauernden Reperfusion ausgesetzt waren (Tabelle 6).

	Sham	Ischämie/Reperfusion	Amiodaron
Zytoplasmatische Vakuolisierung	1,63 ± 0,38	3,10 ± 0,17 <sup>#</sup>	3,25 ± 0,25 <sup>#</sup>
PAS	1,21 ± 0,05	0,84 ± 0,05 <sup>#</sup>	0,80 ± 0,09 <sup>#</sup>

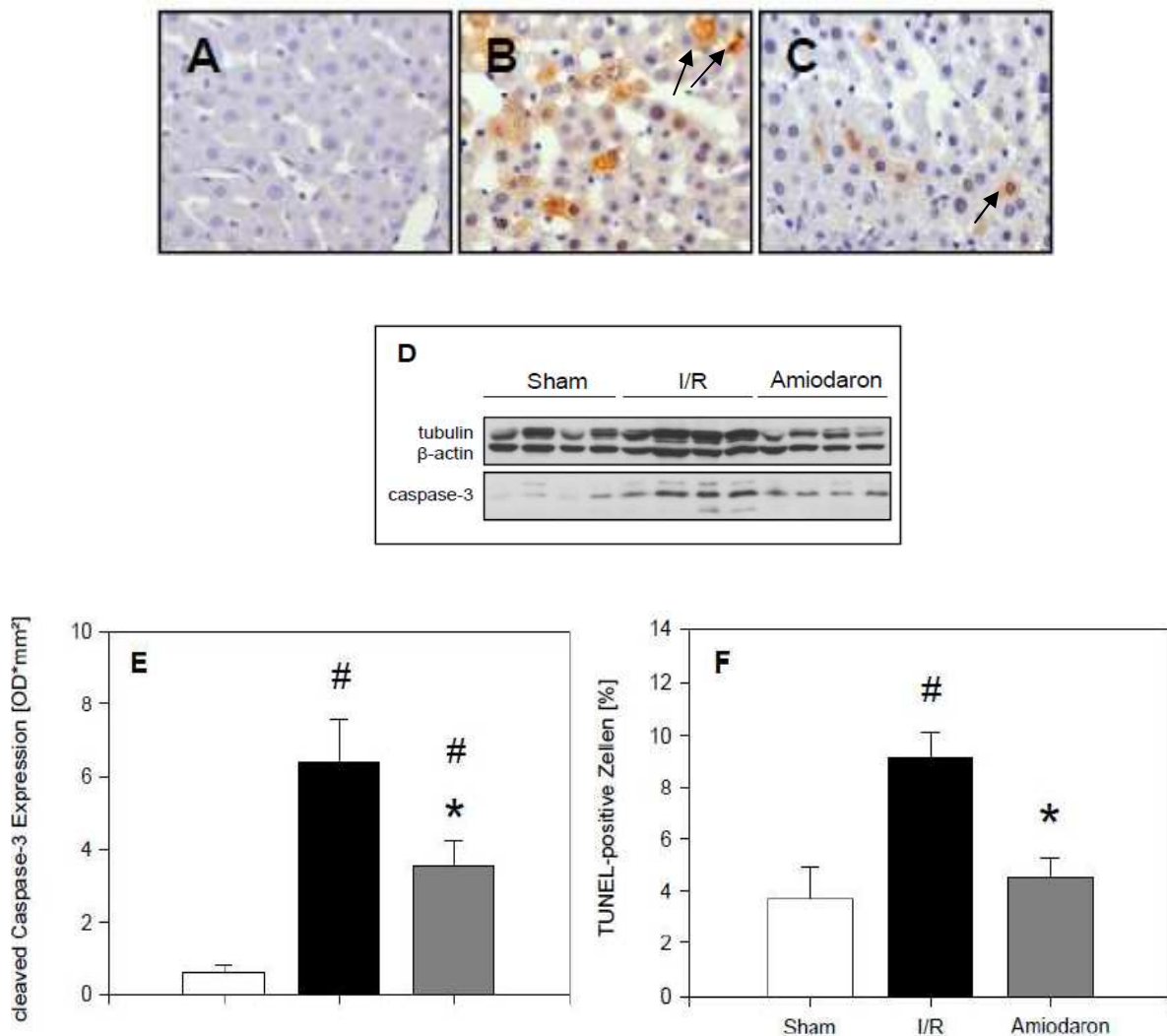
**Tabelle 6.** Die semiquantitative Beurteilung der zytoplasmatischen Vakuolenbildung erfolgte mit einem Score von 0-4, die des periodic acid Schiff (PAS) positiven Gewebes mit einem Score von 1-3 (siehe Material und Methoden) nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron oder Kochsalzlösung (Ischämie/Reperfusion) vorbehandelt und die Lebern über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24-stündigen kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham.

#### 4.2.6 Apoptotischer Zelltod und Stressantwort

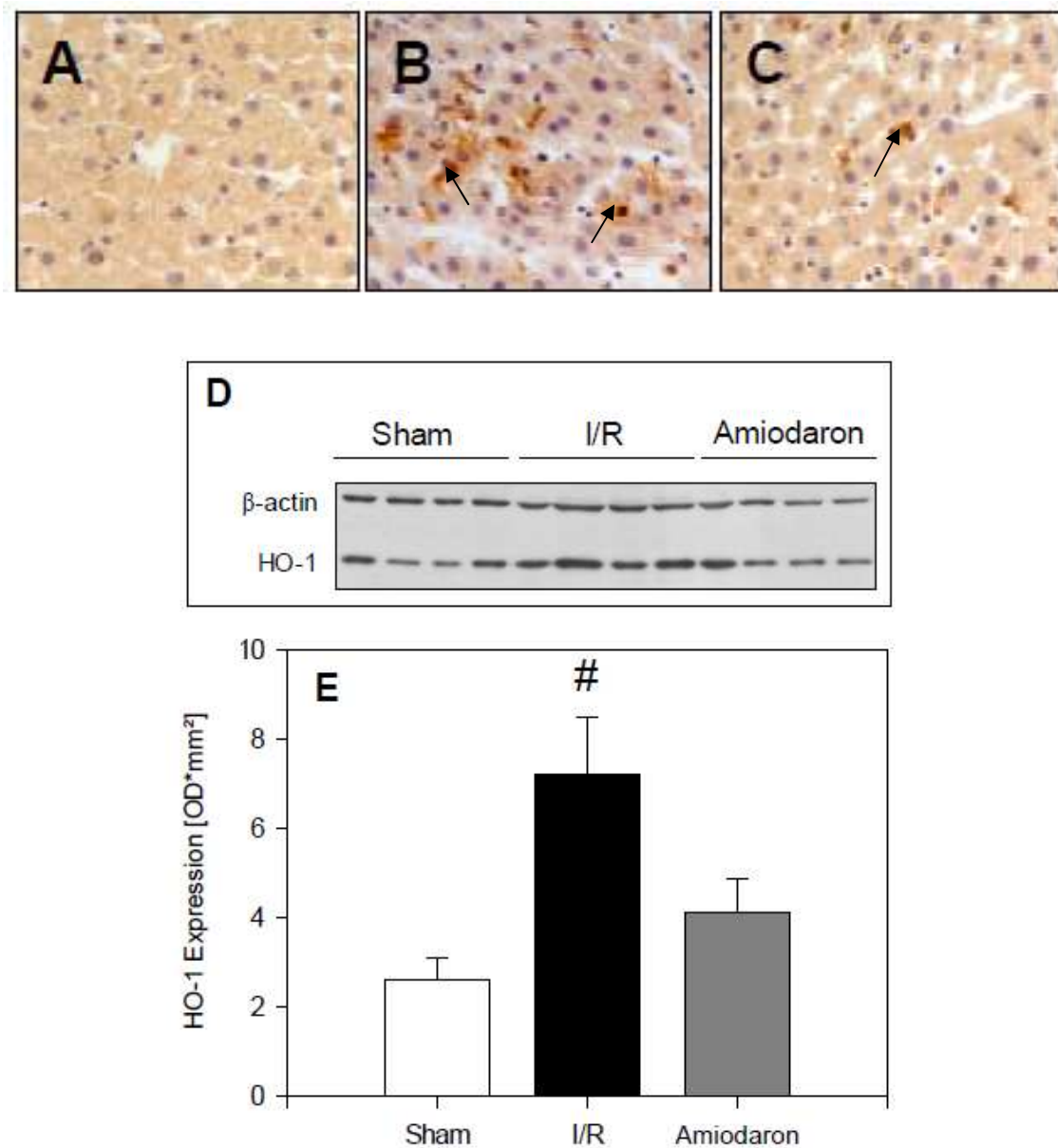
Die cleaved Caspase-3 Produkte wurden als Indikator für den programmierten Zelltod gewertet. I/R löste eine signifikante Erhöhung der Caspase-3 Aktivität im Vergleich zu den Sham-Kontrollen (Abb. 16) aus. Die Vorbehandlung mit AM verringerte den apoptotischen Zelltod signifikant, wie dies in der Immunhistochemie und den Western Blot Analysen ( $p < 0,05$ ; Abb. 16) zum Ausdruck kam. Die TUNEL Analyse bestätigte den signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelltodes bei den Leberpräparaten, die einer kalten Ischämie und Reperfusion ausgesetzt wurden. Zudem konnte unter Verwendung der TUNEL Methode die signifikante Verringerung des apoptotischen Zelltods bei den Lebern, die mit AM

vorbehandelt wurden, bestätigt werden ( $p < 0,05$ ; Abb. 16).

Die Hämoxxygenase (HO)-1 wurde als hinweisend für zellulären Stress nach kalter Ischämie und Reperfusion gemessen. I/R bewirkte eine signifikante Zunahme von HO-1 im Vergleich zu Sham-Kontrollen ( $p < 0,05$ ; Abb. 17). Die Vorbehandlung mit AM reduzierte den zellulären Stress auf Werte, die mit den HO-1 Werten in Sham-Kontrollen vergleichbar waren (Abb. 17).



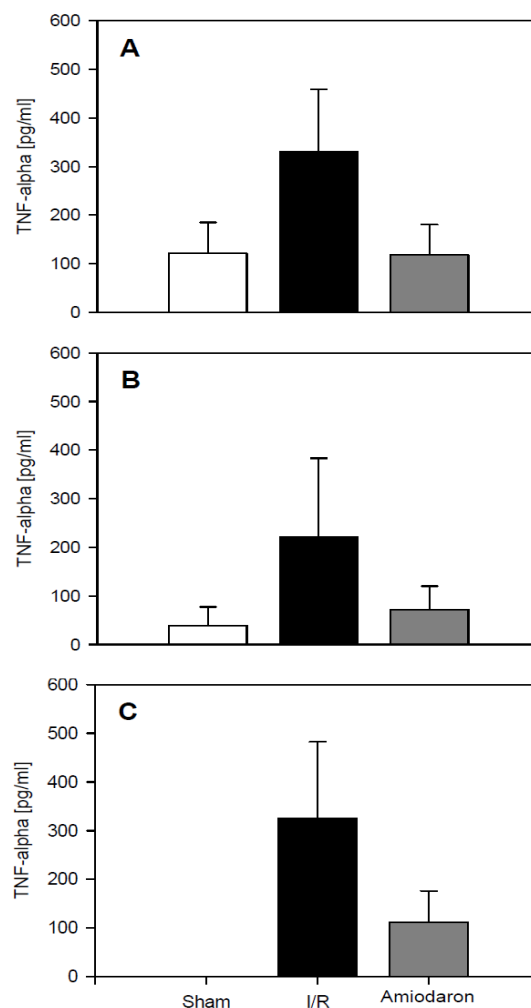
**Abbildung 16.** Ausmaß des apoptotischen Zelltods gemessen mit Immunhistochemie (A-C) und Western Blot Analyse (D, E) von cleaved Caspase-3 Produkten (A-E) und TUNEL Analyse (F). Die Untersuchung wurde nach 60min Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung durchgeführt. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (C, graue Balken in E, F) oder Kochsalzlösung (I/R; B, schwarze Balken E, F) vorbehandelt und die Lebern über einen Zeitraum von 24h in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Lebern unbehandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienen als Sham-Kontrolle (A, weiße Balken in E, F). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$  in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. Sham, <sup>\*</sup> $p < 0,05$  vs. I/R. Vergrößerung (A-C): x120



**Abbildung 17.** Immunhistochemie (**A-C**) und Western Blot Analyse (**D,E**) der Hämoxxygenase (HO)-1. Die Untersuchung wurde nach 60min Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung durchgeführt. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (**C**; graue Balken in **E**) oder Kochsalzlösung (I/R; **B**, schwarze Balken in **E**) vorbehandelt und die Lebern über einen Zeitraum von 24h in 4°C kalter HTK-Lösung aufbewahrt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (**A**, weiße Balken in **E**). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben; <sup>#</sup>p<0,05 vs. Sham. Vergrößerung (**A-C**): x120

#### 4.2.7 Tumornekrosefaktor-alpha

Die Freisetzung von TNF-alpha in das Effluat wurde mittels ELISA gemessen. Im ersten Effluat nach I/R ergab die Konzentration von Zytokinen einen dreifachen Anstieg gegenüber der Sham-Kontrolle (Abb. 18). Das Ausmaß an TNF-alpha blieb auch während des weiteren Beobachtungszeitraums von 60 Minuten erhöht, obgleich diese Erhöhung sich als nicht signifikant erwies, was höchstwahrscheinlich durch die starken Schwankungen, die bei dem Anstieg der TNF-alpha Konzentrationen auftraten, bedingt war. Die Vorbehandlung mit AM konnte erfolgreich den Anstieg der TNF-alpha Konzentrationen über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg vollständig verhindern (Abb. 18).



**Abbildung 18.** Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) Konzentration im Effluat zum Zeitpunkt 5s (A), 30min (B) und 60min (C) Reperfusion mit 37°C warmer KH-Lösung nach 24h Konservierung in 4°C kalter HTK-Lösung. Die Spendertiere wurden mit 5 mg/kg Körpergewicht Amiodaron (graue Balken) oder Kochsalzlösung (I/R, schwarze Balken) vorbehandelt. Lebern un behandelter Tiere, welche keiner 24h kalten Konservierung ausgesetzt waren, dienten als Sham-Kontrolle (weiße Balken). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8 in jeder Gruppe) angegeben.



## 5 Diskussion

Das wesentliche Ergebnis des ersten Abschnitts der vorliegenden Studie besteht darin, dass die kurzfristige Multidrug Donor Präkonditionierung (MDDP) von Lebern nach 24-stündiger kalter Konservierung, dem postischämischen Reperfusionsschaden nahezu vollständig entgegenwirkt. Diese Schutzfunktion ist durch die anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkung der MDDP Vorbehandlung bedingt.

Für die Versuchsreihe wurde ein isoliertes Reperfusionsmodell an der Rattenleber nach einer 24-stündigen kalten Ischämie verwendet. Dadurch war es möglich, eine relevante postischämische Schädigung nach 60-minütiger Reperfusion zu erzielen. Diese beinhaltete die gesamte Breite bereits bekannter I/R Folgen, einschließlich der Produktion von Sauerstoffradikalen, der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, der Stressantwort im Gewebe und des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes.

Die UW- und HTK-Lösungen erwiesen sich bei der Verringerung von Konservierungsschäden bei transplantierten Lebern als erfolgreich [Mühlbacher F et al., 1999]. Beide Lösungen bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Substanzen, die alle geeignet sind, Konservierungs- und I/R- Schäden im Vergleich zur Ringer-Lösung zu reduzieren. [Mühlbacher F et al., 1999].

Aktuelle Studien haben aber auch zeigen können, dass die Präkonditionierung mit pharmakologischen Substanzen in der Lage ist, den Schutz der Leber vor postischämischer Schädigung gegenüber herkömmlichen Konservierungslösungen zu verbessern [Nishizawa H et al., 1997; Lai IR et al., 2008; Montero EF et al., 2005; Shen SQ et al., 2007; El-Ghoneimi A et al., 2007; Johnson DW et al., 2006; Schmeding M et al., 2007; Kim SH et Lee SM, 2008; Zhang SJ et al., 2006; Duenschede F et al., 2006; Glanemann M et al., 2004; Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003]. Dementsprechend wird die Vorbehandlung von Spenderorganen als ein vielversprechender Ansatz bei der Verbesserung der Ergebnisse der Organkonservierung und Transplantation diskutiert [Lai IR et al., 2008; Duenschede F et al., 2006; Glanemann M et al., 2004; Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003]. Mit dem Ziel den bestmöglichen Schutz für das Spenderorgan durch eine zusätzliche Präkonditionierung zu erreichen und die postischämische Leberschädigung abzuschwächen, wurden acht unterschiedliche Wirkstoffe in der gegenwärtigen MDDP Untersuchung eingesetzt. Diese Substanzen liefern Schutz vor I/R Schäden am Spenderorgan auf Grund von anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Eigenschaften und zeichnen sich vor allem durch ihr pleiotropes Wirkungsprofil aus [Menger MD et Vollmar B, 2007], wie dies beispielsweise bei Simvastatin [Dold S et al., 2009], Glycin [Moussavian MR et al., 2007; Moussavian MR et al., 2008], Erythropoietin [Le Minh K et al., 2007; Seehofer D et al., 2008]

und Methylprednisolon [Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003] beschrieben wurde. Die Daten unserer gegenwärtigen Untersuchung zeigen nun, dass die kombinierte Gabe von protektiven Wirkstoffen in Form von MDDP es ermöglicht, den kalten I/R Schaden nahezu vollständig zu verhindern. Obwohl keine detaillierte Information über den individuellen Beitrag jeder einzelnen dieser Substanzen geliefert werden konnte, kann zusammengefasst werden, dass MDDP einen Ansatz darstellt, bei dem ähnlich wie bei der erwähnten UW- oder HTK-Lösung unterschiedliche Inhaltsstoffe sich als wirkungsvoll im Hinblick auf die Verbesserung der Organqualität nach Konservierung erweisen. Bei der I/R spielen verschiedene pathophysiologische Mechanismen eine Rolle, so dass auch unterschiedliche Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen zur Verminderung der I/R Schäden notwendig sind.

Bei Curcumin handelt es sich um einen gelb-orangen Farbstoff, der aus dem Gelbwurz Gewürz stammt. Shen und Mitarbeiter [Shen SQ et al., 2007] haben gezeigt, dass dieser Wirkstoff Schutzfunktionen in einem warmen I/R Rattenmodell ausübt und dass diese Schutzwirkung mit der Verminderung der Hitzeschockproteine, der anti-oxidativen Enzyme und des apoptotischen Zelltods einhergeht. Diese Wirkungseigenschaften des Curcumins tragen zur Verhinderung der HO-1 Expression, der Bildung von MDA und der Caspase-3 Aktivierung bei, wie dies in der aktuellen Studie beobachtet werden konnte.

Pentoxifyllin stellt ein Methylxanthinderivat und einen Phosphodiesterasehemmer dar und kommt üblicherweise zur Behandlung von peripheren Gefäßerkrankungen zum Einsatz. Nishizawa und Mitarbeiter [Nishizawa H et al., 1997] zeigten in einem Spender Vorbehandlungsversuch an Rattenlebern, dass Pentoxifyllin die Aktivierung der Kupfferzellen unterdrückt und die durch die I/R hervorgerufene Schädigung vermindert. Pentoxifyllin verhindert nicht nur die Produktion von TNF-alpha während der hepatischen I/R, sondern vermindert auch die Aktivierung der Leukozyten und das Ausmaß des durch Apoptose verursachten Zelltods im mikrovaskulären Gewebe in der postischämischen Phase [Rüdiger HA et al., 2002; Müller JM et al., 1997]. Diese Wirkungsweise des Pentoxifyllins ist in der Lage, die TNF-alpha Freisetzung, die Leukozyteninfiltration und den apoptotischen Zelltod aufzuheben, wie dies bei den I/R Lebern nach Gabe des MDDP beobachtet wurde.

Simvastatin ist ein Hemmer der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase und als Leberenzym für die Hemmung der Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure, die einen Vorläufer der Sterole und des Cholesterols darstellt, verantwortlich. Die Inhibierung der HMG-CoA Reduktase vermindert die Anhäufung von Mevalonsäure und damit auch den Gehalt an Cholesterol in den Leberzellen [Yeung AC, 2002]. Neueste experimentelle Untersuchungen haben ergeben, dass Statine auch die Entzündungsreaktionen und die Zellproliferation in den Gefäßendothelien und den glatten Muskelzellen unterdrücken [Lai IR et al., 2008; Horimoto H et al., 2002] und den I/R Schaden

in der Leber [Lai IR et al., 2008] und der Niere [Inman SR et al., 2003] vermindern können. Von Interesse ist dabei, dass die pleiotropen Wirkungen der Statine nicht ihren lipidsenkenden Eigenschaften zugeschrieben werden [Yeung AC et al., 2002; Lefer DJ, 2002], sondern eher durch anti-oxidative Fähigkeiten [Yeung AC et al., 2002; Lefer DJ, 2002], sowie durch ein inhibitorisches Wirkprofil auf die Leukozytenadhäsion [Dold S et al., 2009; Schramm R et al., 2007] und eine regulierende Funktionsweise auf die Mikrozirkulation bedingt sind [Dold S et al., 2009; Tokunaga T et al., 2008]. Diese dargestellten Eigenschaften der Statine könnten ebenfalls zur Schutzfunktion der MDDP Vorbehandlung in der I/R-MDDP Gruppe beigetragen haben.

N-Acetylcystein (NAC) ist eine Thiol-enthaltende Verbindung, die eine Vorstufe des Glutathion darstellt [Montero EF et al., 2005]. Es kann auch unmittelbar als Radikalfänger von freien Sauerstoffradikalen dienen [Nagasaki H et al., 1998]. Glutathion kann zusätzlich als zellulärer Oxidationshemmer agieren [Nagasaki H et al., 1998]. Die I/R Schädigung der Leber geht mit der Entleerung der GSH Speicher einher [Smyrniotis V et al., 2005]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Auffüllung des Glutathions das Ausmaß der I/R Schädigung während der postischämischen Reperfusion reduziert, und dass NAC sich als wirkungsvoll bei der Wiederherstellung der Glutathionspeicher in der Leber erweist [Smyrniotis V et al., 2005]. Hierdurch sind wohl die protektiven Eigenschaften im I/R Modell bedingt [Montero EF et al., 2005]. Neben den antioxidativen Eigenschaften des NAC könnte das positive Wirkprofil gegenüber I/R Schäden zusätzlich durch sein antiinflammatorisches Potential, welches die Verminderung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und die Aggregation von Leukozyten beinhaltet [Zhang SJ et al., 2006; Koeppel TA et al., 1996], bedingt sein.

Bei Erythropoietin (EPO) handelt es sich um ein endogenes Hormon, dass von den intestinalen Fibroblasten der Niere und der fetalen Leber gebildet wird. Es ist ein potentieller Stimulator der Knochenmarksaktivität und erhöht die Bildung der roten Blutkörperchen [Perez-Ruixo JJ et al., 2008]. Die Eigenschaften von EPO, die eine Schutzfunktion vor I/R Schäden bewirken, können antioxidative und antiapoptotische Effekte beinhalten [Sepodes B et al., 2006] und auch mit einer Downregulation der TNF-alpha Produktion und einer vermehrten Expression von eNOS [Lindenblatt N et al., 2007] einhergehen. Da TNF-alpha eine postischämische Leukozyteninfiltration induziert [Donnahoo KK et al., 1999] und eNOS die Fähigkeit besitzt, die Anhaftung der Leukozyten zu vermindern und die Mikrozirkulation durch Vasodilatation zu verbessern [Gao x et al., 2007; Chan BP et al., 2004], könnten beide Eigenschaften des EPOs zur Reduktion des I/R Schadens beigetragen haben.

Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxy-Tryptamine) ist ein lipophiles Indoleaminprodukt, das von der Epiphyse gebildet wird. Melatonin und seine Metaboliten sind stark wirksame Antioxidantien, die sich als gut verträglich und nicht giftig erwiesen haben [Korkmaz A et al., 2009]. Über

Melatonin wird berichtet, dass es den hepatozellulären Schaden nach warmer I/R vermindert [Kim SH et Lee SM, 2008] und die Funktion der Leber nach kalter Konservierung und Reperfusion verbessert [Zhang WH et al., 2006; Freitas I et al., 2006]. Exogenes Melatonin übt seine antioxidative Wirkung auch dadurch aus, dass es die Aktivität der Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase nach I/R verbessert und dabei die Anhäufung von MDA im postischämischen Lebergewebe vermindert [Korkmaz A et al., 2009; Freitas I et al., 2006]. Dadurch könnte Melatonin im Rahmen der MDDP Behandlung zum Schutz vor Reperfusionsschäden durch die Aufhebung der Wirkungen der Sauerstoffradikale und der damit im Zusammenhang stehenden Anhäufung von MDA einen wichtigen Beitrag geleistet haben. Interessant ist dabei, dass Melatonin die Leistungsfähigkeit der Mitochondrien erhöht und hepatischen I/R Schäden auch dadurch entgegenwirkt, dass es das Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid und Endothelin verbessert [Zhang WH et al., 2006]. Diese Ergebnisse heben die pleiotropen Eigenschaften von Melatonin hervor und lassen darauf schließen, dass auch andere Wirkmechanismen als die anti-oxidativen Eigenschaften an der durch MDDP vermittelten Schutzfunktion vor kalter Ischämie und Reperfusion beteiligt sein könnten.

Glyzin ist eine nicht-essentielle Aminosäure und stellte sich bei der Verminderung von Schäden, die durch kalte Ischämie und Reperfusion verursacht werden, in mehreren Versuchen als erfolgversprechend dar [Duenschede F et al., 2006]. Die Wirkung des Glyzins während der kalten Ischämie beruht auf einer Abschwächung der Kupfferzellaktivierung, woraus eine signifikante Verringerung der Freisetzung von TNF-alpha resultiert [Duenschede F et al., 2006]. Bemerkenswert hierbei ist, dass Glyzin es auch ermöglicht, den apoptotischen Zelltod der sinusoidalen Endothelzellen nach kalter I/R in der Leber zu verhindern [Zhang SJ et al., 2005; Jacob T et al., 2003]. Folglich könnte die verminderte TNF-alpha Freisetzung und das Ausbleiben der cleaved Caspase-3 Expression nach MDDP Behandlung durch das Wirkprofil von Glyzin verursacht sein.

Die ersten Befunde über die protektiven Wirkungen der Steroide auf die Leberischämie wurden 1975 von Santiago Delpin und Figueroa veröffentlicht [Santiago Delpin EA et Figueroa I, 1975]. Sie beschrieben, dass die Gabe von Methylprednisolon vor der Leberentnahme eine Zunahme der Überlebenszeit bei den Tieren und einen verminderten Leberschaden im Vergleich zur nicht behandelten ischämischen Kontrollgruppe bewirkte [Santiago Delpin EA et Figueroa I, 1975]. Von Interesse hierbei erscheint, dass Methylprednisolon keinen Einfluss auf die hepatische Proteinsynthese während der Ischämie ausübt, deren Reaktivierung während der Reperfusion hingegen wirkungsvoll erhöht. Diese Wirkmechanismen konnten immer noch nicht ganz geklärt werden. Man geht davon aus, dass Methylprednisolon in der Lage ist, die Zellmembran durch die Stabilisierung der lysosomalen Membran zu schützen, oder die Freisetzung toxischer Substanzen aus der

Leber während der Ischämie einzuschränken [Wang Y et al., 1996]. Abgesehen hiervon könnte Methylprednisolon den I/R Schaden dadurch verringern, dass es die während der Konservierung hervorgerufene Schädigung durch Kupfferzellen eindämmt [Chimalakonda AP et Mehvar R, 2003].

Man kann zusammenfassen, dass die kurzfristige pharmakologische Präkonditionierung eine wirkungsvolle, klinisch gut anwendbare Ergänzung bei der Verbesserung der Organkonservierung darstellen könnte. Alle Substanzen, die in unserem MDDP Protokoll enthalten sind, erwiesen sich in den gegenwärtigen Untersuchungen wirkungsvoll, die Leberschädigung nach Ischämie und Reperfusion zu reduzieren. Interessant war dabei die Tatsache, dass MDDP sich in diesen Versuchen als geeignet herausstellte, den hepatischen Reperfusionsschaden trotz der langen Konservierungsdauer von 24 Stunden in HTK-Lösung nahezu vollständig aufzuheben. Obgleich die Eigenschaften und Auswirkungen der verwendeten Substanzen bereits intensiv untersucht wurden, erschien es uns erstrebenswert, das Ausmaß der Wirkungen von den einzelnen Substanzen in Kombination zu erfassen. Tatsache ist, dass die MDDP Vorbehandlung die durch I/R verursachte Produktion von Sauerstoffradikalen, die durch Zytokine ausgelöste zelluläre Stressreaktion, die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und den apoptotischen Zelltod nahezu vollständig aufhebt. Die Präkonditionierung mit MDDP könnte gerade bei kritischen Transplantaten einen wichtigen Beitrag zur Reduzierung des primären Organversagens leisten.

Die wesentlichen Ergebnisse im zweiten Versuchsabschnitt dieser Studie bestanden darin, dass die Präkonditionierung mit Amiodaron eine anti-oxidative Wirkung zeigt, aber dass diesem protektiven Wirkprofil des AM gleichzeitig das Auftreten von mitochondrialer Schädigung und hepatozellulärer Funktionsbeeinträchtigung entgegenstehen.

Auch im zweiten Versuchsabschnitt wurde ein isoliertes Leberperfusionsmodell ex vivo mit einem Perfusat, welches frei von Blutzellen war, verwendet. Ich bin mir darüber bewusst, dass die einzelnen Blutzellen, wie beispielsweise Leukozyten und Thrombozyten, eine wesentliche Rolle bei der Auslösung von Reperfusionsschäden spielen. Dennoch war es für uns von Interesse die antioxidativen Eigenschaften und die unmittelbare Toxizität des AM auf die Leber selektiv zu erforschen. Daher haben wir uns bei diesem reduktiven Ansatz entschieden, die Versuche zur Reperfusion ohne Blutzellen durchzuführen, um komplexere Interaktionen und additive Freisetzungen von proinflammatorischen Zytokinen und sonstigen Mediatoren aus diesen Blutzellen mit den direkten Wirkungen des AM zu verhindern.

Durch Sauerstoffradikale entstandener Schaden ist dafür bekannt, innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Einsetzen der postischämischen Reperfusion zu wirken. Auch in diesem Modell bewirkte die initiale Reperfusionsdauer von einer Stunde eine Lipidperoxidation, eine

Membranschädigung, eine Beeinträchtigung der hepatischen exkretorischen Funktion und einen apoptotischen Zelltod.

Der Kaliumkanalblocker AM wird häufig für die Behandlung supraventrikulärer und ventrikulärer Herzrhythmusstörungen eingesetzt [Vassallo P et Trohman RG, 2007]. Bei AM handelt es sich um ein Antiarrhythmikum der Klasse III, welches die Phase drei des kardialen Aktionspotentials verlängert [Feld GK et al., 1984]. AM zeigt Wirkeigenschaften auf den sinuatrialen und atrioventrikulären Knoten, die denen von Betablockern ähneln und die Refraktärphase durch die Blockierung von Kaliumkanälen verlängern und die intrakardiale Leitungsgeschwindigkeit des Aktionspotentials im Herzen verlangsamen [Toyama J et al., 1996]. AM wird weitgehend in der Leber verstoffwechselt und hemmt die Aktivität der Cytochrom P450 Isoenzymgruppe [Klotz U, 2007; Waldhauser KM et al., 2006]. Lapenna und Mitarbeiter [Lapenna D et al., 2001] waren die ersten, die die anti-oxidative Aktivität von AM im Kupfer-katalysierten Oxidationsmodell der non-HDL Fraktion demonstrierten.

AM konnte die Oxidation über eine Reduktion der Thiobarbituratsäure-reaktiven Substanzen, der Lipidperoxidation und der konjugierten Dienebildung hemmen. Diese protektive Wirkung konnte auch in vivo bei therapeutisch anwendbaren Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden [Lapenna D et al., 2001]. Hingegen konnten andere Wissenschaftler zeigen, dass AM auch in der Lage ist, pro-oxidative Wirkungen hervorzurufen. Nicolescu und Mitarbeiter [Nicolescu AC et al., 2008] wiesen die Zytotoxizität von AM in HPL1A Zellen im menschlichen peripheren Lungenepithel nach. Diese war durch eine unmittelbare Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien bedingt, welcher die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) vorausgegangen war. Im Einklang zu dieser Beobachtung demonstrierten Waldhauser und Mitarbeiter [Waldhauser KM et al., 2006] an isolierten Leberzellen einen durch AM hervorgerufenen Anstieg der ROS, welche einen apoptotisch und nekrotisch bedingten Zelltod verursachte. In den hier durchgeführten Versuchen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit AM zu einer signifikanten Reduktion der Lipidperoxidation nach 24-stündiger kalter Ischämie und 60-minütiger Reperfusion führt. Dies konnte durch die verminderte Konzentration an MDA im Effluat nachgewiesen werden.

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen, dass die kalte I/R die Bildung der ROS und die Manifestierung des apoptotischen Zelltods begünstigt. Dies konnte durch die erhöhten MDA Werte und TNF-alpha Konzentrationen und eine Zunahme der cleaved Caspase-3 bestätigt werden. ROS sind dafür bekannt, apoptotischen Zelltod auszulösen [Orrenius S et al., 2007]. Folglich bestand ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der MDA und TNF-alpha Werte nach AM Vorbehandlung mit einer Reduktion der cleaved Caspase-3 und der Anzahl TUNEL-positiver Zellen, was die anti-oxidative Schutzwirkung des AM belegt.

Die Untersuchungen des Zellmembranschadens über die Freisetzung der LDH im Effluat

ergaben eine signifikant reduzierte Membranintegrität innerhalb der I/R Gruppe. Die Vorbehandlung mit AM war hierbei nicht in der Lage, die Membranschäden im ersten Effluat der Reperfusion zu vermindern. Dagegen konnte AM im weiteren Verlauf der Reperfusion die LDH Freisetzung aus den Leberzellen deutlich reduzieren. Dieses Ergebnis korreliert mit der verminderten Lipidperoxidation durch eine AM Präkonditionierung, die während der Reoxygenierung erzeugt wird, worüber auch schon andere Wissenschaftler berichtet haben [Baudin B et al., 1996].

Es konnte gezeigt werden, dass der oxidative Stress eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie des Reoxygenierungsschadens in der Leber spielt [Marzi I et al., 1992]. Reaktive Sauerstoffradikale haben schädigende Auswirkungen auf die Leberzellen, zu denen auch die Schädigung der Mitochondrien zählt [Lee WY, 2005]. In vitro Versuche mit Herzmuskelzellen und Lebermitochondrien haben ergeben, dass AM eine inhibitorische Wirkung auf die durch Sauerstoffradikale vermittelte Lipidperoxidation der Mitochondrien des Herzens und der Rattenleber ausübt [Ide T et al., 1999; Ribeiro SM et al., 1997]. Allerdings war in der vorliegenden Studie die GLDH, welche als Hinweis für mitochondriale Schädigung dienen kann, nach AM Vorbehandlung nicht verringert. Vielmehr zeigte sich die GLDH Aktivität nicht nur im Vergleich zu den Sham-Kontrollen, sondern auch im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung vorbehandelten I/R Lebern signifikant erhöht. Dies könnte auf eine ausgeprägte, durch Radikale hervorgerufene Schädigung oder auf eine durch AM unmittelbar ausgelöste mitochondriale Toxizität hinweisen. Obwohl angenommen wird, dass AM die Entstehung von intrazellulären Radikalen fördert [Waldhauser KM et al., 2006], gibt es Belege dafür, dass die durch AM verursachte Toxizität eher aufgrund von mitochondrialen Funktionsbeeinträchtigungen als durch eine Überproduktion von ROS entsteht [Nicolescu AC et al., 2008]. Tatsächlich hätte ich auch eine Zunahme des apoptotischen Zelltods und damit auch eine Zunahme der Freisetzung an cleaved Caspase-3 erwartet, wenn in der vorliegenden Studie die mitochondriale Schädigung nach AM Vorbehandlung durch eine Überexpression von ROS erzeugt worden wäre. Die signifikante Abnahme der Caspase-3 Aktivität nach AM Gabe belegt, dass AM antioxidativ wirkt und dass der ausgeprägte mitochondriale Schaden durch einen Mechanismus ausgelöst wird, der unabhängig von der Entstehung von ROS ist.

Es wird davon ausgegangen, dass die mitochondriale Schädigung, wie sie nach Vorbehandlung mit AM beobachtet wurde, mit einem erhöhten mitochondrialen Zelltod in Zusammenhang steht. Dennoch muss sich aus dem mitochondrialen Schaden, der durch AM erzeugt wurde, nicht notwendigerweise ein apoptotischer Zelltod ergeben [Varbiro G et al., 2003]. Die Tatsache, dass der apoptotische Zelltod nach AM Vorbehandlung verglichen mit den unbehandelten I/R Tieren verringert werden konnte, ist sehr wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die antioxidativen Eigenschaften deutlich stärker zum

Ausdruck kommen, als die Induktion der Apoptose aufgrund der mitochondrialen Toxizität des AM. Um weiter zu klären, ob der apoptotische Zelltod in der vorliegenden Studie durch Mechanismen ausgelöst wird, die nicht unmittelbar mit einer Schädigung der Mitochondrien einhergehen, stellten wir die Überlegung an, ob Apoptose auch durch eine Zunahme der TNF-alpha Freisetzung aus den Kupfferzellen hervorgerufen werden könnte. Diese Hypothese wird durch unsere Daten, die eine Zunahme der TNF-alpha Werte nach I/R aufwiesen, welche nach AM Vorbehandlung allerdings deutlich verringert war, gestützt. Dadurch könnte auch die Abschwächung des apoptotischen Zelltods durch AM trotz der erhöhten mitochondrialen Schädigung erklärt werden.

Der Gallefluss wird als ein wesentlicher Indikator für die exkretorische Funktion der Leberzellen verwendet [Xu H et al., 2004; Jonas E et al., 2006; Smrekova R et al., 2000; Bowers BA et al., 1987]. In unseren Experimenten drosselte die Vorbehandlung mit AM den Gallefluss bereits während der Operation des Spendertieres, bevor das Organ durchspült und der kalten Ischämie ausgesetzt wurde. Unsere Daten können nicht klären, ob diese Funktionsstörung der Lebern durch die hepatotoxische Wirkung des AM verursacht wurde, oder ob sie durch die durch AM vermittelte Funktionshemmung der Kaliumkanäle bedingt ist. Hill berichtete, dass der 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonat-Anionentransport-hemmer einen Kaliumkanalblocker-sensitiven  $K^+$  Einstrom, der mit verminderter hepatischer exokriner Sekretion einhergeht, aktiviert [Hill CE, 1999]. In der Tat stellen der  $Na^+-K^+-2Cl^-$  Cotransport, der  $Cl^-/HCO_3^-$  Austausch und die Barium-sensitiven  $K^+$  Kanäle wichtige Komponenten bei der Stimulierung der Galleflussekretion in den Leberzellen dar [Hill CE et al., 2002]. Dies deutet darauf hin, dass die Kaliumkanalblockade die exkretorische Funktionsfähigkeit der Leberzellen sowohl unter Standardbedingungen als auch nach kalter Ischämie und Reperfusion beeinträchtigen kann. Allerdings kann ich auch nicht ausschließen, dass AM die exkretorische Funktion der Leber durch die Verursachung eines frühen mitochondrialen Schadens negativ beeinflusst hat.

Die Blockierung von  $K^+$  Kanälen spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Zellvolumens und des pH-Werts [Ollivier H et al., 2006; Häussinger D et al., 2006]. Dementsprechend ist die Verringerung des pH-Werts nach AM Vorbehandlung sehr wahrscheinlich auf die Blockierung von  $K^+$  Kanälen durch die Hemmung des Austausches von Wasserstoffionen zurückzuführen. Die Regulierung des Zellvolumens, welche aufgrund einer Zellschwellung erfolgt, geht mit der Freisetzung von Ionen durch Aktivierung von  $K^+$  Kanälen und/oder Anionenkanälen, des  $KCl$ -Cotransports oder der gleichzeitigen Aktivierung des  $K^+/H^+$  und  $Cl^-/HCO_3^-$  Austausches einher. Die Zellvolumenregulierung, die aufgrund einer Schrumpfung der Zellen eingeleitet wird, führt zur Anhäufung von Ionen durch Aktivierung des  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Cotransports, des  $Na^+/H^+$  Austausches parallel zum  $Cl^-/HCO_3^-$  Austausch, oder parallel zur Aktivierung von  $Na^+$  Kanälen [Panayiotidis MI et al., 2006]. Die Blockierung



von  $K^+$  Kanälen innerhalb dieser Kaskade, die durch das AM eingeleitet wird, könnte nicht nur den pH-Wert, sondern auch das Zellvolumen vermindert haben. Dies könnte der Grund für die Verringerung des Lebergewichtes sein, wie es nach AM Vorbehandlung beobachtet wurde.

Schließlich konnte bei unseren Versuchen gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Organspendern mit dem Kaliumkanalblocker AM signifikante anti-oxidative Wirkungseigenschaften bei der kalten Ischämie und Reperfusion der Leber hervorruft. Neben diesen protektiven Funktionen zeigt AM allerdings auch hepatotoxische Eigenschaften, die die Erzeugung von Schädigungen der Mitochondrien und die Beeinträchtigung der exkretorischen Funktionsfähigkeit der Leberzellen beinhalten. Da diese Leberzelltoxizität das Versagen des Spenderorgans herbeiführen kann [Lewis JH et al., 1989; Norris W et al., 2007; Lim PK et al., 1984], sollte die Behandlung mit AM als antiarrhythmische Therapie bei potentiellen Leberspendern mit Vorsicht durchgeführt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ainscow EK, Brand MD. Internal regulation of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1999; 266: 737-749.
2. Baudin B, Bénéteau-Burnat B, Giboudeau J. Cytotoxicity of amiodarone in cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1996; 10: 557-560.
3. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow: an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987; 42: 565.
4. Chan AL, Hsieh HJ, Hsieh YA, Lin SJ. Fatal amiodarone-induced hepatotoxicity: a case report and literature review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2008; 46: 96-101.
5. Chan BP, Reichert WM, Truskey GA. Effect of streptavidin-biotin on endothelial vasoregulation and leukocyte adhesion. *Biomaterials* 2004; 25: 3951-3961.
6. Chen H, Yu YY, Zhang MJ, Deng XX, Yang WP, Ji J et al. Protective effect of doxorubicin induced heat shock protein 72 on cold preservation injury of rat livers. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1375-1378.
7. Cheung RT, Hachinski V. Cardiac Effects of Stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2004; 6: 199-207.
8. Chimalakonda AP, Mehvar R. Effects of duration of ischemia and donor pretreatment with methylprednisolone or its macromolecular prodrug on the disposition of indocyanine green in cold-preserved rat livers. *Pharm Res* 2003; 20: 1001-1008.
9. Cicco G, Panzera PC, Catalano G, Memeo V. Microcirculation and reperfusion injury in organ transplantation. *Adv Exp Med Biol* 2005; 566: 363-373.
10. Colivicchi F, Bassi A, Santini M, Caltagirone C. Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement. *Stroke.* 2004; 35: 2094-2098.
11. Di Pasquale G, Pinelli G, Andreoli A, Manini G, Grazi P, Tognetti F: Holter detection of cardiac arrhythmias in intracranial subarachnoid hemorrhage. *Am J Cardiol* 1987; 59: 596-600.
12. Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 466-474.
13. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: 922-929.

14. Duenschede F, Westermann S, Riegler N, Miesner I, Erbes K, Ewald P et al. Different protection mechanisms after pretreatment with glycine or alpha-lipoic acid in a rat model of warm hepatic ischemia. *Eur Surg Res* 2006; 38: 503-512.
15. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF et al. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford)* 2007; 9: 112-119.
16. El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. *Hepatology* 2004; 39: 1553-1562.
17. Eurotransplant Report 2007
18. Feld GK, Nademanee K, Weiss J, Stevenson W, Singh BN. Electrophysiologic basis for the suppression by amiodarone of orthodromic supraventricular tachycardias complicating pre-excitation syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1984; 3: 1298-1307.
19. Franco-Gou R, Mosbah IB, Serafin A, Abdennebi HB, Roselló-Catafau J, Peralta C. New preservation strategies for preventing liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1120-1126.
20. Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, Ferrigno A, Boncompagni E, Rizzo V et al. In situ demonstration of improvement of liver mitochondria function by melatonin after cold ischemia. *In Vivo* 2006; 20: 229-237.
21. Fukuda C, Kollmar O, Schäfer T, Tian YH, Schilling MK. Anionic polysaccharides. A class of substances with hepatoprotective and antiadhesive properties in rat liver preservation. *Transpl Int* 2002; 15: 17-23.
22. Gao X, Xu X, Belmadani S, Park Y, Tang Z, Feldman AM et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1269-1275.
23. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Münchow S, Dikopoulos N, Lippek F et al. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135: 203-214.
24. Häussinger D, Reinehr R, Schliess F. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187: 249-255.
25. Hata K, Tolba RH, Wei L, Doorschodt BM, Büttner R, Yamamoto Y et al. Impact of polysol, a newly developed preservation solution, on cold storage of steatotic rat livers. *Liver Transpl* 2007; 13: 114-121.
26. Hill CE. The anion transport inhibitor DIDS activates a Ba<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> flux associated with hepatic exocrine secretion. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 268-275.

27. Hill CE, Briggs MM, Liu J, Magtanong L. Cloning, expression, and localization of a rat hepatocyte inwardly rectifying potassium channel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: 233-240.
28. Horimoto H, Nakai Y, Nakahara K, Nomura Y, Mieno S, Sasaki S. HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin prolonged rat cardiac allograft survival by blocking intercellular signals. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 440-445.
29. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Takeshita A. Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action. *Circulation* 1999; 100: 690-692.
30. Inman SR, Davis NA, Olson KM, Lukaszek VA. Simvastatin attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats administered cyclosporine A. *Am J Med Sci* 2003; 326: 117-121.
31. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Kallakuri S. Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery* 2003; 134: 457-466.
32. Jain A, Reyes J, Kashyap R, Dodson SF, Demetris AJ, Ruppert K et al. Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg* 2000; 232: 490-500.
33. Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC. Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int* 2006; 69: 1806-1813.
34. Jonas E, Näslund E, Freedman J, Befrits R, Blomqvist L, Siösteen AK, Jacobsson H, Hultcrantz R. Measurement of parenchymal function and bile duct flow in primary sclerosing cholangitis using dynamic 99mTc-HIDA SPECT. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 674-681.
35. Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44: 165-171.
36. Klotz U. Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 985-996.
37. Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C et al. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1397-1402.
38. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43-50.
39. Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, Chen CF. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. *Transplantation* 2008; 85: 732-738.

40. Lapenna D, Ciofani G, Bruno C, Pierdomenico SD, Cuccurullo F. Antioxidant activity of amiodarone on human lipoprotein oxidation. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 739-745.
41. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007; 170: 1954-1963.
42. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock*. 2005; 24: 370-375.
43. Lefer DJ. Statins as potent antiinflammatory drugs. *Circulation* 2002; 106: 2041-2042.
44. Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, Seeff LB, Zimmerman HJ. Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology* 1989; 9: 679-685.
45. Lim PK, Trewby PN, Storey GC, Hole DW. Neuropathy and fatal hepatitis in a patient receiving amiodarone. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 288: 1638-1639.
46. Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B. Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1191-1198.
47. Marzi I, Knee J, Bühren V, Menger M, Trentz O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 1992; 111: 90-97.
48. McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46: 178-191.
49. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies. *Transplant Proc* 2007; 39: 485-488.
50. Montero EF, Quireze C Jr, d'Oliveira DM. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005; 37: 425-427.
51. Moussavian MR, Kollmar O, Jacob P, Richter S, Schilling MK. Legislation on organ donation. An internet based survey. *Tx Med* 2007; 19: 117-122.
52. Moussavian MR, Slotta JE, Kollmar O, Menger MD, Schilling MK, Gronow G. Hemoglobin induces cytotoxic damage of glycine-preserved renal tubules. *Transpl Int* 2007; 20: 884-894.

53. Moussavian MR, Slotta JE, Kollmar O, Menger MD, Gronow G, Schilling MK. Post-hypoxic cellular disintegration in glycine-preserved renal tubules is attenuated by hydroxyl radical scavengers and iron chelators. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 303-310.
54. Moussavian MR, Kollmar O, Schmidt M, Scheuer C, Wagner M, Slotta JE et al. Amiodarone pretreatment of organ donors exerts anti-oxidative protection but induces excretory dysfunction in liver preservation and reperfusion. *Liver Transplant* 2009; 7: 763-775.
55. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 2069-2070.
56. Müller JM, Vollmar B, Menger MD. Pentoxifylline reduces venular leukocyte adherence ("reflow paradox") but not microvascular "no reflow" in hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1997; 71: 1-6.
57. Nagasaki H, Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Baek Y et al. Efficacy of preconditioning with N-acetylcysteine against reperfusion injury after prolonged cold ischaemia in rats liver in which glutathione had been reduced by buthionine sulfoximine. *Eur J Surg* 1998; 164: 139-146.
58. Naidech AM, Kreiter KT, Janjua N, Ostapkovich ND, Parra A, Commichau C, Fitzsimmons BF, Connolly ES, Mayer SA: Cardiac troponin elevation, cardiovascular morbidity, and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Circulation* 2005; 112: 2851-2856.
59. Nicolescu AC, Ji Y, Comeau JL, Hill BC, Takahashi T, Brien JF, Racz WJ, Massey TE. Direct mitochondrial dysfunction precedes reactive oxygen species production in amiodarone-induced toxicity in human peripheral lung epithelial HPL1A cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 227: 370-379.
60. Nishizawa H, Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T et al. Efficiency of pentoxifylline in donor pretreatment in rat liver transplantation. *J Surg Res* 1997; 72: 170-176.
61. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 287-297.
62. Nygaard CE, Townsend RN, Diamond DL. Organ donor management and organ outcome: a 6-year review from a Level I trauma center. *J Trauma*. 1990; 30: 728-32.
63. Ollivier H, Pichavant K, Puill-Stephan E, Roy S, Calvès P, Nonnotte L, Nonnotte G. Volume regulation following hyposmotic shock in isolated turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes. *J Comp Physiol* 2006; 176: 393-403.
64. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*. 2007; 39: 443-455.

65. Panayiotidis MI, Bortner CD, Cidlowski JA. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase please stand up? *Acta Physiol (Oxf)*. 2006; 187: 205-15.
66. Pérez-Ruixo JJ, Krzyzanski W, Hing J. Pharmacodynamic analysis of recombinant human erythropoietin effect on reticulocyte production rate and age distribution in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 399-415.
67. Rätz Bravo AE, Drewe J, Schlienger RG, Krähenbühl S, Pargger H, Ummenhofer W. Hepatotoxicity during rapid intravenous loading with amiodarone: Description of three cases and review of the literature. *Crit Care Med* 2005; 33: 128-134. Review.
68. Reasor MJ, McCloud CM, Beard TL, Ebert DC, Kacew S, Gardner MF, Aldern KA, Hostetler KY. Comparative evaluation of amiodarone-induced phospholipidosis and drug accumulation in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1996; 106: 139-147.
69. Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T et al. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* 2005; 18: 1079-1089.
70. Ribeiro SM, Campello AP, Nascimento AJ, Kluppel ML. Effect of amiodarone (AMD) on the antioxidant enzymes, lipid peroxidation and mitochondrial metabolism. *Cell Biochem Funct* 1997; 15: 145-152.
71. Richter S, Yamauchi J, Minor T, Menger MD, Vollmar B. Heparin and phentolamine combined, rather than heparin alone, improves hepatic microvascular procurement in a non-heart-beating donor rat-model. *Transpl Int*. 2000; 13: 225-229.
72. Roy D, Talajic M, Dorian P, Connolly S, Eisenberg MJ, Green M, Kus T, Lambert J, Dubuc M, Gagné P, Nattel S, Thibault B. Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med*. 2000; 342: 913-920.
73. Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; 122: 202-210.
74. Salim A, Martin M, Brown C, Belzberg H, Rhee P, Demetriades D. Complications of brain death: frequency and impact on organ retrieval. *Am Surg*. 2006; 72: 377-381.
75. Sandker GW, Slooff MJ, Groothuis GM. Drug transport, viability and morphology of isolated rat hepatocytes preserved for 24 hours in University of Wisconsin solution. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1479-1485.
76. Santiago Delpín EA, Figueroa I, López R, Vázquez J. Protective effect of steroids on liver ischemia. *Am Surg* 1975; 41: 683-685.

77. Schilling M, Tian YH, Büchler MW. Effect of temperature on hepatic and renal uptake of components from University of Wisconsin solution. *Transplantation* 1998; 65: 989-992.
78. Schmeding M, Neumann UP, Boas-Knoop S, Spinelli A, Neuhaus P. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res* 2007; 39: 189-197.
79. Schramm R, Menger MD, Harder Y, Schmits R, Adam O, Weitz-Schmidt G et al. Statins inhibit lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Immunology* 2007; 120: 315-324.
80. Schrem H, Till N, Becker T, Bektas H, Manns MP, Strassburg CP et al. Long-term results after liver transplantation. *Chirurg* 2008; 79: 121-129.
81. Seehofer D, Neumann UP, Schirmeier A, Carter J, Cho SY, Lederer A et al. Synergistic effect of erythropoietin but not G-CSF in combination with curcumin on impaired liver regeneration in rats. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 325-332.
82. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M et al. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 2006; 19: 919-926.
83. Shen SQ, Zhang Y, Xiang JJ, Xiong CL. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1953-1961.
84. Smreková R, Vajdová K, Kukan M, Uličná O, Lutterová M, Wsóllová L, Horecký J. A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation*. 2000; 70: 430-436.
85. Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoropoulos T, Theodoraki K, Farantos C et al. Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J Surg Res* 2005; 129: 31-37.
86. Tokunaga T, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, Morine Y, Shinohara H et al. Beneficial effects of fluvastatin on liver microcirculation and regeneration after massive hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2989-2994.
87. Tomlinson DR, Cherian P, Betts TR, Bashir Y. Intravenous amiodarone for the pharmacological termination of haemodynamically-tolerated sustained ventricular tachycardia: is bolus dose amiodarone an appropriate first-line treatment? *Emerg Med J*. 2008; 25: 15-18.
88. Toyama J, Kamiya K, Cheng J, Lee JK, Suzuki R, Kodama I. Ion channel blockers in the treatment of chronic heart failure. *J Card Fail* 1996; 2: 243-249.



89. Varbiro G, Toth A, Tapodi A, Bogнар Z, Veres B, Sumegi B, Gallyas F Jr. Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307: 615-625.
90. Vassallo P, Trohman RG. Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications. *JAMA*. 2007;298:1312-1322. Waldhauser KM, Török M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, Follath F, Krähenbühl S. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319: 1413-1423.
91. Waldhauser KM, Török M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, Follath F, Krähenbühl S. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319: 1413-1423.
92. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Jaeschke H. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against liver injury via membrane stabilization not inhibition of lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 714-720.
93. Wartenberg KE, Schmidt JM, Claassen J, Temes RE, Frontera JA, Ostapkovich N, Parra A, Connolly ES, Mayer SA: Impact of medical complications on outcome after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med* 2006; 34: 617-623.
94. Wolff M, Kalff JC, Schwarz NT, Lauschke H, Minor T, Tolba RH, Hirner A. Liver transplantation in Germany *Zentralbl Chir* 2003; 128: 831-841.
95. Xu H, Lee CY, Clemens MG, Zhang JX. Prolonged hypothermic machine perfusion preserves hepatocellular function but potentiates endothelial cell dysfunction in rat livers. *Transplantation*. 2004; 77: 1676-1682.
96. Yeung AC, Tsao P. Statin therapy: beyond cholesterol lowering and antiinflammatory effects. *Circulation* 2002; 105: 2937-2938.
97. Zhang SJ, Shi JH, Tang Z, Wu Y, Chen S. Protective effects of glycine pretreatment on brain-death donor liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005; 4: 37-40.
98. Zhang SJ, Ma TW, Ma XX, Gou JJ, Shi JH, Guo WZ. Protective effects of N-acetylcysteine on brain-dead rat liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006; 5: 428-431.
99. Zhang WH, Li JY, Zhou Y. Melatonin abates liver ischemia/reperfusion injury by improving the balance between nitric oxide and endothelin. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 574-579.

## **7 Danksagung/Publikationen**

### **7.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch seine stete Unterstützung und seine konstruktive Kritik hat er maßgeblich am Erfolg dieser Arbeit mitgewirkt.

Besonders danke ich auch meinem Betreuer Herrn Dr. med. Mohammed Reza Moussavian, der mich bei den Versuchen hervorragend unterstützt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch er hat durch sein Engagement entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. rer.nat. Claudia Scheuer sowie Janine Becker bedanken, die mich durch die Erstellung von Laboranalysen und histologischen Präparaten unterstützt haben.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau Elisabeth Gluding, die mir in technischen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, Jutta und Dr. med. Hans-Joachim Schmidt, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets unterstützt haben.

## 7.2 Publikationen

### Originalarbeiten

Moussavian MR, Kollmar O, Schmidt M, Scheuer C, Wagner M, Slotta JE, Gronow G, Justinger C, Menger MD, Schilling MK. Amiodarone pretreatment of organ donors exerts anti-oxidative protection but induces excretory dysfunction in liver preservation and reperfusion. *Liver Transplant* 2009; 7: 763-775.

Moussavian MR, Scheuer C, Schmidt M, Kollmar O, Wagner M, von Heesen M, Schilling MK, Menger MD. Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 2: 231-241.

## **8 Lebenslauf**

### **Personalien**

Name: Schmidt, Thomas Michael

Geburtsdatum: 01.09.1980

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Konfession: Evangelisch

Anschrift: Winterfloß 17, D-66539 Neunkirchen

### **Schulische Ausbildung**

- August 1987 bis Juli 1991 Besuch der Maximilian-Kolbe-Grundschule in Wiebelskirchen (Saarland)
- September 1991 bis Juni 2001 Besuch des Gymnasiums am Steinwald in Neunkirchen/Saar
- Juni 2001 Allgemeine Hochschulreife (Abitur) in Neunkirchen/Saar

### **Universitäre Ausbildung**

- Oktober 2002 bis März 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
- August 2005 Ärztliche Vorprüfung in Homburg/Saar
- August 2008 bis Juli 2009 Praktisches Jahr, Städtisches Klinikum, Neunkirchen
- April 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Homburg/Saar
- Mai 2010 Approbation als Arzt

**Zivildienst und Berufserfahrung/Praktika**

- August 2001 bis Mai 2002 Zivildienst an der Biedersbergschule für lernbehinderte Kinder in Neunkirchen/Saar
- seit 1998 Verschiedene Praktika und Famulaturen im medizinischen Bereich, z.B. Pädiatrie, Psychiatrie, Gynäkologie, Radiologie, Innere Medizin, Allgemeinmedizin und Notfallmedizin.

**Beruflicher Werdegang**

- Juni 2010 bis November 2010 Weiterbildungsassistent in der Praxis für Allgemeinmedizin bei Herrn Dr. med. H-J. Schmidt in Neunkirchen-Wellesweiler.
- Dezember 2010 bis Mai 2011 Assistenzarzt für Innere Medizin in der Marienhausklinik St. Josef Kohlhof.
- seit Juni 2011 Assistenzarzt für Innere Medizin im Knappschafts Krankenhaus Sulzbach/Saar.